



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I747876 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：106103463

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 02 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/24 (2006.01)

C12Q1/68 (2018.01)

(30)優先權：2016/01/30

歐洲專利局

16153540.6

2017/01/30

世界智慧財產權組織

PCT/EP2017/051902

(71)申請人：英商安全保護生技系統公司 (英國) SAFEGUARD BIOSYSTEMS HOLDINGS LTD  
(GB)

英國

(72)發明人：克拉普 侯格 KLAPPROTH, HOLGER (DE)；史密特 尼可拉斯 SMIT, NICOLAAS  
(US)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 2010/065420A2

WO 2013/091102A1

WO 2013/096799A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：10 共 79 頁

(54)名稱

用於從微生物中萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸的珠粒撞擊管及方法

(57)摘要

本文之揭示內容提供用於珠粒撞擊之改良方法與有用於其之珠粒撞擊系統。該珠粒撞擊系統包含樣本管、珠粒、與乾封阻劑，以及使用該珠粒撞擊系統以自含有核酸之細胞萃取核酸之方法。

The present disclosure provides improved methods for bead beating and a bead beating system useful therefor. The bead beating system comprises a sample tube, beads, and a dry blocking agent, and methods for using the bead beating system to extract nucleic acids from cells containing the nucleic acids.

指定代表圖：

符號簡單說明：

1 . . . 珠粒撞擊系統

2 . . . 樣本管

6 . . . 封閉蓋

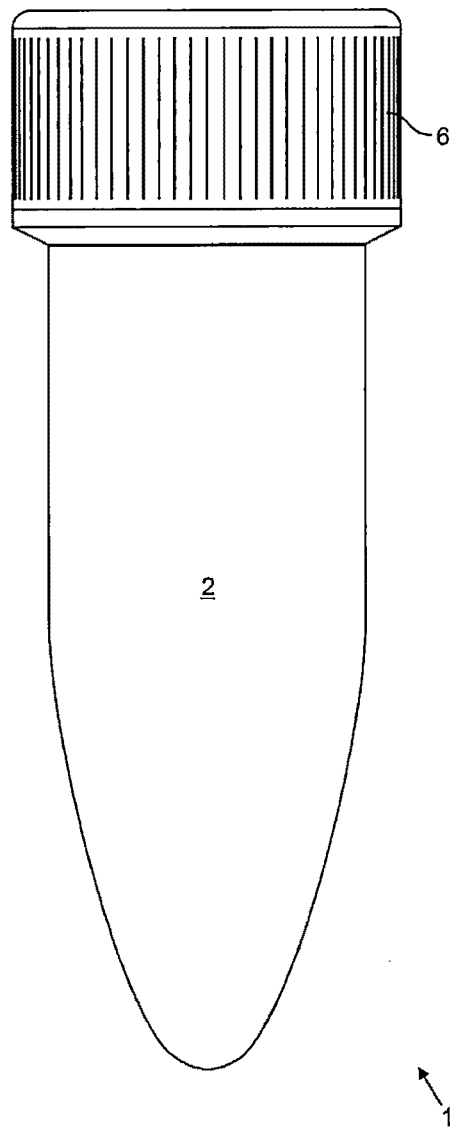


圖 1

I747876

# 發明摘要

※ 申請案號：**106103463**

※ 申請日：**106/02/02**

※IPC 分類：**C12Q 1/24** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於從微生物中萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸的珠粒撞擊管及方法

Bead Beating Tube and Method for Extracting Deoxyribonucleic Acid and/or

Ribonucleic Acid from Microorganisms

## 【中文】

本文之揭示內容提供用於珠粒撞擊之改良方法與有用於其之珠粒撞擊系統。該珠粒撞擊系統包含樣本管、珠粒、與乾封阻劑，以及使用該珠粒撞擊系統以自含有核酸之細胞萃取核酸之方法。

## 【英文】

The present disclosure provides improved methods for bead beating and a bead beating system useful therefor. The bead beating system comprises a sample tube, beads, and a dry blocking agent, and methods for using the bead beating system to extract nucleic acids from cells containing the nucleic acids.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

1. 珠粒撞擊系統
2. 樣本管
6. 封閉蓋

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於從微生物中萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸的珠粒撞擊管及方法

Bead Beating Tube and Method for Extracting Deoxyribonucleic Acid and/or

Ribonucleic Acid from Microorganisms

【0001】 本申請案主張 2016 年 1 月 30 日提申之歐洲專利申請案編號 EP16153540 之優先權利益，其內容係以其之全體以用方式納入。

## 【技術領域】

【0002】 本發明係關於用於珠粒撞擊之改良方法與有用於其之珠粒撞擊系統。

## 【先前技術】

【0003】 感染性疾病之遺傳檢定與診斷於臨床微生物學之領域中扮演重要角色。為克服基於培養之方法學固有之偏差與限制，遺傳檢定越來越常被用於偵測樣本中所含之微生物。為了使如此遺傳檢定可被執行，細胞必須被溶胞以允許以越高越好之濃度自微生物萃取 DNA 及/或 RNA。

【0004】 Zhongtang Yu 等人，2004, “Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples,” BioTechniques, Vol. 36(5):808-812 描述用於自被消化物與糞樣本分離 DNA 之方法。於該方法中，0.25 g 之取自母牛之胃腸系統之樣本液（其被假定為含有微生物（即細菌））

首先與 1 mL 之含有 500 mM 氯化鈉、50 mM Tris 鹽酸鹽，pH 8.0、50 mM 伸乙二胺四乙酸、與 4% 十二烷基硫酸鈉之緩衝液混合。此外，0.4 g 無菌氧化鋯珠粒被導入該樣本液中。所獲得之混合物隨後於樣本管中以 Mini-BeadBeater™ 振盪三分鐘，使得珠粒破壞微生物之細胞壁。於此程序中，細胞中所含之 DNA 被釋放。該緩衝液亦有用於保護 DNA 免於被樣本液中所含之 DNA 酶降解。於執行該珠粒撞擊後，雜質係藉由以醋酸銨沈澱來自樣本移除。核酸係藉由以異丙醇沈澱來獲得。於進一步方法步驟中，DNA 係依序以 RNA 酶與蛋白酶 K 消化並隨後以管柱純化。

【0005】 該方法有以下不利：其係相對複雜的。因為樣本液由於該緩衝液之添加而被稀釋，樣本中之 DNA 濃度減低。因此，該方法僅允許有限之偵測正確性與敏感性。

【0006】 因此，存在有對於用於溶胞樣本液中所含之微生物之細胞並自其萃取核酸之改良裝置與方法之需求。

### 【發明內容】

【0007】 本文之揭示內容係關於改良之珠粒撞擊管與珠粒撞擊系統與方法。無意受限於理論，發明人相信珠粒撞擊允許核酸溶解至溶液中。本文之揭示內容係（部分）基於以下發現：於核酸萃取方法中使用珠粒撞擊會由於在珠粒上之吸附而造成核酸損失，且如此損失可藉由適當量之封阻劑以封阻珠粒上之結合位置來預防。本文之揭示內容亦係基於以下認識：雖然一些先前用於珠粒撞擊中之溶胞緩衝液可能含有可扮演封阻劑之試劑，如此試劑可以遠低於典型所使用者之量使用。進一步，本文之揭示

內容亦係基於以下認識：一些生物樣本（諸如血液）固有地含有封阻劑且因此可在添加劑（諸如溶胞緩衝液）不存在下經歷珠粒撞擊。

【0008】 於某些方面，本文之揭示內容提供珠粒撞擊系統，其適合在珠粒撞擊以下者時使用：不固有地含有封阻劑或含有量低於所述適用於有效封阻核酸被珠粒吸附者之封阻劑之樣本。本文之揭示內容之珠粒撞擊系統包括乾封阻劑。令人意外地，結果係當將本文之揭示內容之撞擊撞擊系統用於溶胞微生物與自液體樣本中所含之微生物萃取去氧核糖核酸（DNA）及/或核糖核酸（RNA）時，可達成比在使用不含有該封阻劑之相對應珠粒撞擊管時大之 DNA 及/或 RNA 萃取率。

【0009】 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統亦可規避於珠粒撞擊前結合樣本與溶胞溶液之需要，其由於沒有樣本稀釋而允許回收較大量之核酸。

【0010】 於又另一個方面，本文之揭示內容提供用於執行珠粒撞擊以溶胞細胞並自生物樣本萃取核酸之方法。所述方法包含在溶胞緩衝液不存在下對該生物樣本執行珠粒撞擊。所述珠粒撞擊方法可利用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統或標準珠粒撞擊系統。當使用標準珠粒撞擊系統時，於一些實施方式中，一或多種封阻劑被加至所述珠粒撞擊系統。於其他實施方式中，尤其在生物樣本天然包括一或多種封阻劑之情況下，無封阻劑於珠粒撞擊前被添加。

【0011】 於某些實施方式中，本文之揭示內容之珠粒撞擊系統係由以下者構成：樣本管，其包含具有內腔之容器構件、用於將含有微生物之樣本液充至該內腔中之孔洞、與用於關閉該孔洞之接附或非接附之封閉物，其中複數個肉眼可見之顆粒被佈置於該內腔中，其適用於在該樣本液被充

至該內腔中且該珠粒撞擊管經受機械振盪時機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁。例示性珠粒系統係於以下第 4.1 節與經編號實施方式 1 至 24 及 67 至 75 描述。可用於所述珠粒撞擊系統之例示性樣本管係於第 4.1.1 節描述，可用於所述珠粒撞擊系統之例示性封阻劑係於第 4.1.2 節描述，且可用於所述珠粒撞擊系統之例示性珠粒係於第 4.1.3 節描述。

【0012】 本文之揭示內容進一步係關於用於溶胞微生物以自所述微生物萃取去氧核糖核酸（DNA）及/或核糖核酸（RNA）之方法，其中樣本液被提供（其被假定為含有所述微生物），其中複數個相對於彼此係可移動之顆粒被導入該樣本液中且該於其中含有顆粒之樣本液被振盪以使得所述顆粒能夠機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁。自其可萃取 DNA 之例示性樣本係於第 4.2 節描述且可用於在核酸萃取前製備樣本之例示性樣本預處理步驟係於第 4.3 節描述。用於自樣本（例如自於第 4.2 節描述之樣本或已如於第 4.3 節中描述地預處理之樣本）萃取核酸之例示性方法係於以下第 4.4 節與經編號實施方式 25 至 58 與 76 至 81 描述。有用於執行本文之揭示內容之核酸萃取方法之套組係於以下第 4.7 節與經編號實施方式 59 至 66 描述。

### 【圖式簡單說明】

【0013】 圖 1：包含樣本管(2)與封閉蓋(6)之例示性珠粒撞擊系統(1)之側視圖。

【0014】 圖 2：於圖 1 顯示之珠粒撞擊系統之俯視圖。

【0015】 圖 3：於圖 1 顯示之珠粒撞擊系統之底視圖。

【0016】 圖 4：通過於圖 1 顯示之珠粒撞擊系統之中心面之縱截面，其中該封閉蓋自該樣本管移除，顯露通過其可進入該樣本管之內腔(3)之孔洞(4)。珠粒(7)與冷凍乾燥封阻劑(8)係於該內腔內顯示。

【0017】 圖 5：通過充以樣本液(5)之於圖 1 顯示之珠粒撞擊系統之中心面之縱截面。

【0018】 圖 6：顯示使用於珠粒撞擊後自白色念珠菌回收之 DNA 作為模版之 PCR 擴增產物之強度。Calbi144 與 Calbi54 係二種不同之白色念珠菌目標基因且 HCO1-Rat87 係負對照組基因。此研究顯示尿素於珠粒撞擊中具有封阻性功效，促進白色念珠菌 DNA 自 PD 液之回收。

【0019】 圖 7：顯示使用於珠粒撞擊後自白色念珠菌回收之 DNA 作為模版之 PCR 擴增產物之強度。Calbi144 與 Calbi54 係二種不同之白色念珠菌目標基因且 HCO1-Rat87 係負對照組基因。此研究顯示 RNA 於珠粒撞擊中具有封阻性功效，促進白色念珠菌 DNA 自 PD 液之回收。

【0020】 圖 8：顯示使用於珠粒撞擊後自白色念珠菌回收之 DNA 作為模版之 PCR 擴增產物之強度。Calbi144 與 Calbi54 係二種不同之白色念珠菌目標基因且 HCO1-Rat87 係負對照組基因。對應於萃取之最大理論產量之量之白色念珠菌 DNA 被包括以作為模版。此研究顯示白色念珠菌 DNA 可在添加劑不存在下藉由珠粒撞擊血液回收。

【0021】 圖 9：顯示使用於珠粒撞擊後自白色念珠菌回收之 DNA 作為模版之 PCR 擴增產物之強度。自其探測之基因係用於偵測真細菌(Eub)、革蘭氏陰性細菌(Gng)、革蘭氏陽性細菌(Gpo)、大腸桿菌(Eco)、葡萄球菌屬(staphylocci)(AllStaph)、腸桿菌科(enterobacteriaceae)(Ent)、金黃

色葡萄球菌 (Sau)、分枝桿菌 (Myco)。N03 Rat 87 係負對照組，且 CC 係內部對照組。對應於萃取之最大理論產量之量之金黃色葡萄球菌 DNA 被包括作為模版。此研究顯示金黃色葡萄球菌 DNA 可在添加劑不存在下藉由珠粒撞擊血液回收。

【0022】 圖 10：顯示使用於珠粒撞擊後自白色念珠菌回收之 DNA 作為模版之 PCR 擴增產物之強度。自其探測之基因係用於偵測真細菌 (Eub)、革蘭氏陰性細菌 (Gng)、革蘭氏陽性細菌 (Gpo)、大腸桿菌 (Eco)、葡萄球菌 (AllStaph)、腸桿菌科 (Ent)、金黃色葡萄球菌 (Sau)、分枝桿菌 (Myco)。N03 Rat 87 係負對照組，且 CC 係內部對照組。對應於萃取之最大理論產量之量之大腸桿菌 DNA 被包括作為模版。此研究顯示大腸桿菌 DNA 可在添加劑不存在下藉由珠粒撞擊血液回收。

### 【實施方式】

【0023】 珠粒撞擊係用於溶胞細胞以釋放其等之內容物(包括其等之核酸 (DNA 與 RNA)) 之均質化程序。樣本被置於具有適當之研磨珠粒之管子內並經受高能混合。所述樣本典型地接著被離心且溶胞產物被從所述珠粒上回收。典型地，經受珠粒撞擊之樣本係以溶胞緩衝液處理以促進 DNA 自細胞釋放。

【0024】 本文之揭示內容係關於改良之珠粒撞擊方法與系統。所述珠粒撞擊方法可在不使用溶胞緩衝液下執行，簡化細胞溶胞與核酸萃取之程序且避免樣本稀釋同時使導因於在珠粒上之吸附之損失減至最小。

【0025】 本文之揭示內容之方法係關於使用適當量之封阻劑執行珠

粒撞擊。所述封阻劑對於該樣本而言可係外源性或內源性。例如，血液含有尿素，一種被發現會封阻生物樣本中之核酸與珠粒撞擊珠粒之結合之試劑。因此，本文之揭示內容提供在不添加外源性封阻劑下珠粒撞擊如此樣本之方法，雖然以外源性封阻劑補充內源性封阻劑亦被思量。對於不含有內源性封阻劑或含有低量之內源性封阻劑之生物樣本，可使用外源性封阻劑。本文之揭示內容進一步提供珠粒撞擊系統，至其內乾封阻劑被併入，其允許在無造成樣本稀釋之試劑之添加下珠粒撞擊生物樣本。

【0026】 因此，本文之揭示內容提供包括乾封阻劑之珠粒撞擊系統。本文之揭示內容進一步提供用於執行珠粒撞擊以溶胞生物樣本中之細胞並自其萃取核酸之方法。所述方法包含在溶胞緩衝液不存在下對所述生物樣本執行珠粒撞擊。所述珠粒撞擊方法可利用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統或標準珠粒撞擊系統。當使用標準珠粒撞擊系統時，於一些實施方式中，一或多種封阻劑被加至所述珠粒撞擊系統。於其他實施方式中，尤其在生物樣本天然地包括一或多種封阻劑之情況下，無封阻劑在珠粒撞擊前被添加。

【0027】 本文中亦提供含有（或適用於獲得）本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之套組。

#### 4.1 珠粒撞擊系統

【0028】 本文之揭示內容提供有用於細胞溶胞與自液體樣本中所含之細胞（例如微生物）萃取去氧核糖核酸（DNA）與核糖核酸（RNA）之珠粒撞擊系統。本文之揭示內容之珠粒撞擊系統包含樣本管、與位在該樣

本管內之珠粒與乾封阻劑。可用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之封阻劑包括尿素、胍鹽、清潔劑、核苷酸、與寡核苷酸。封阻劑係於第 4.1.2 節詳細描述。可用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之珠粒包括包含礦物質及/或金屬之珠粒。適合用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之珠粒係於第 4.1.3 節描述。

#### 4.1.1 樣本管

【0029】 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統包含樣本管，其具有可透過孔洞進入且可容納珠粒、封阻劑、與液體樣本的內腔。該樣本管可以任何生物惰性材料（例如塑膠或硼矽酸鹽）構成，且較佳地係以塑膠（例如聚丙烯、聚丙烯共聚物、或聚碳酸酯）構成。用於本文中，術語「管子」涵蓋小瓶（例如研磨小瓶）與管子（例如錐形管）。

【0030】 該珠粒撞擊系統可包括用於遮蓋該孔洞並密封該樣本管之封閉物。該封閉物可被固定至該樣本管（例如藉由鉸鏈固定至該樣本管之蓋子）或可與該樣本管分離（即可移除的蓋子）。該樣本管可包括適用於啮合螺紋蓋之螺紋區域。所述螺紋可在該樣本管之內或外表面上（例如如於圖 4-5 顯示的）。

【0031】 可用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之樣本管係商業上可購得的（例如）螺旋蓋聚丙烯或微量離心管。標準管尺寸可用於製造本文之揭示內容之珠粒撞擊管與系統，例如 0.5 mL、1.7 mL、2 mL、4.5 mL、7 mL、15 mL、50 mL 或 250 mL。

#### 4.1.2 封阻劑

【0032】 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統包括乾封阻劑。用於本文中，「乾」或「乾燥」封阻劑係封阻劑，其含有少於 20%水分。於一些實施方式中，該乾封阻劑含有少於 15%、少於 10%、少於 5%、少於 4%、少於 3%、少於 2%、或少於 1%水分。

【0033】 該乾封阻劑較佳係長期穩定的，即該珠粒撞擊系統可被無問題地運輸與儲存一段較長之時期而該封阻劑之封阻性功效不會相當地減低。該乾封阻劑可被鬆散地佈置於該容器構件之內腔內，及/或該樣本之部分或整個內腔可以封阻劑之層或封阻劑之薄膜塗覆。該封阻劑較佳係經冷凍乾燥。該封阻劑可於所述珠粒被添加至該管前或後被冷凍乾燥。

【0034】 封阻劑之實例包括一或多種離散劑（例如尿素、胍鹽）、一或多種清潔劑、一或多種核苷酸、一或多種寡核苷酸、或任何其等之組合。如此例示性封阻劑之細節係於第 4.1.2.1 至 4.1.2.5 節提出，如下。包含促成微生物細胞井之溶解之封阻劑（例如清潔劑）可改良使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統製備之核酸之產率並規避在珠粒撞擊前結合樣本與溶胞溶液之需要。一般而言，用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之封阻劑之量低於用於溶胞溶液者。

【0035】 珠粒撞擊系統可藉由於珠粒撞擊管中冷凍乾燥溶胞溶液（亦稱為萃取緩衝液或溶胞緩衝液）來產生。含有封阻劑之溶胞溶液係所屬技術領域中已知的或可商業地購得。

【0036】 於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種清潔劑。於一些實施方式中，該封阻

劑包含一或多種核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑與一或多種清潔劑。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑與一或多種核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種清潔劑與一或多種核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種清潔劑與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種核苷酸與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑、一或多種清潔劑、與一或多種核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑、一或多種清潔劑、與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑、一或多種核苷酸與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種清潔劑、一或多種核苷酸、與一或多種寡核苷酸。於一些實施方式中，該封阻劑包含一或多種離散劑、一或多種清潔劑、一或多種核苷酸、與一或多種寡核苷酸。

【0037】 該封阻劑可進一步包含伸乙二胺四乙酸 (EDTA) 及/或其之鈉鹽。EDTA 與鈣、鎂及鐵結合且因此失活化去氧核糖核酸酶與核糖核酸酶。此方法亦對使用該珠粒撞擊系統處理之樣本液中所含之 DNA 與 RNA 之降解起反作用。因此，測量結果之較高偵測敏感性與再現性在檢查使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統自細胞（例如微生物）萃取之 DNA 及/或 RNA 之期間成為可能。

【0038】 該封阻劑可被鬆散地佈置於該容器構件之內腔內，例如呈粉末形式。該粉末可（例如）於該樣本中與所述珠粒混合、或可呈位於所述

珠粒之上及/或之下之一層之形式被佈置於該樣本管內。供選擇地或此外，該樣本管之內壁可至少部分地以封阻劑之層或封阻劑之薄膜塗覆。該層或薄膜可藉由自己加至該樣本管之包含該封阻劑之水性混合物蒸發液體來製備。於其他實施方式中，於該珠粒撞擊系統中之珠粒中之一些或所有者可以該封阻劑塗覆。

#### 4.1.2.1 離散劑

【0039】 離散劑瓦解巨分子（諸如蛋白質與核酸）之結構並變性其。離散溶質因為使鄰接蛋白質之水分子無序化所以減少疏水性區域之淨疏水性效應。此於溶液中溶解疏水性區域，藉此使蛋白質變性。此亦直接適用於脂質雙層中之疏水性區域；若離散溶質之臨界濃度被達到（於該雙層之疏水性區域中），則膜完整性會被破解，且細胞會溶胞。

【0040】 可被用作為封阻劑之例示性離散劑係於以下提供。

【0041】 **尿素**：當該封阻劑包含尿素（或硫脲；用於本文中，除非前後文指定不同者，術語尿素包括硫脲）時，尿素之量可與意欲與該珠粒撞擊系統一起使用之該樣本液之量匹配，以使得在將該樣本液加至該樣本管後溶解於該樣本液中之尿素之濃度範圍介於 10 與 100 克每公升之間、介於 50 與 100 克每公升之間、介於 20 與 50 克每公升之間、或介於 25 與 35 克每公升之間。因此，有關以上實施方式，如果 1 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻試劑之尿素之量會介於 10 與 100 mg 之間、介於 50 與 100 mg 之間、介於 20 與 50 mg 之間、或介於 25 與 35 mg 之間（分別地），且如果 0.8 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻試劑之尿素之量會介於 8 與 80 mg

之間、介於 40 與 80 mg 之間、介於 16 and 40 mg 之間、或介於 20 與 28 mg 之間（分別地）。

【0042】 **鹽**：某些鹽可起離散劑之作用。鹽可藉由遮蔽電荷與預防鹽橋之穩定化而具有離散特性。離散鹽包括種種胍、鋰與鎂之鹽。

【0043】 **胍鹽**：可被用作為本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中之封阻劑之胍鹽包括異氰酸胍、氯化胍、與其等之組合。

【0044】 **鋰鹽**：可被用作為本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中之封阻劑之鋰鹽包括過氯酸鋰、醋酸鋰、與其等之組合。

【0045】 **鎂鹽**：可被用作為本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中之封阻劑之鎂鹽包括氯化鎂。

【0046】 **清潔劑**：某些清潔劑可起離散劑之作用，例如十二烷基硫酸鈉（「SDS」）。使用清潔劑作為封阻劑係於第 4.1.2.3 節描述。

#### 4.1.1.2 肌酐

【0047】 當該封阻劑包含肌酐時，於該樣本管之內腔中該肌酐之存在可對使用該珠粒撞擊系統處理之樣本中所含之 DNA 及/或 RNA 之降解起反作用。此外，肌酐預防該 DNA 及/或 RNA 非專一性地與所述珠粒及/或該樣本管之內壁結合。此在自使用該珠粒撞擊管系統處理之細胞（例如微生物）萃取 DNA 及/或 RNA 時使較大之產率成為可能。

#### 4.1.2.3 清潔劑

【0048】 可被用作為本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中之封阻劑之

清潔劑包含十二烷基硫酸鈉、月桂鹽基硫酸肌胺酸鈉、聚氧乙烯(20)去水山梨醇單月桂酸酯、與其等之組合。聚氧乙烯(20)去水山梨醇單月桂酸酯亦以聚山梨糖醇酯 20 為人所知。

【0049】 用於該封阻劑之清潔劑之量可與意欲與該珠粒撞擊系統一起使用之該樣本液之量匹配。於某些實施方式中，在將該樣本液加至該樣本管後溶解於該樣本液中之清潔劑之濃度範圍在 1 至 50 mg/mL、1 至 25 mg/mL、或 25 至 50 mg/mL。因此，有關以上實施方式，如果 1 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之清潔劑之量範圍會在 1 至 50 mg、1 至 25 mg、或 25 至 50 mg（分別地），且如果 0.8 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之清潔劑之量範圍會在 0.8 至 40 mg、0.8 至 20 mg、或 20 至 40 mg。

#### 4.1.2.4 核苷酸

【0050】 可用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之核苷酸包括核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、與其等之組合。

【0051】 所述核苷酸可係自然存在者。自然存在之核糖核苷酸係腺苷單磷酸、鳥苷單磷酸、胞嘧啶單磷酸、與胸苷單磷酸。可使用之自然存在之去氧核糖核苷酸係封阻劑係去氧腺苷單磷酸、去氧鳥苷單磷酸、去氧胞嘧啶單磷酸、與去氧胸苷單磷酸。

【0052】 所述核苷酸可係自然存在之核苷酸之非自然存在之類似物。非自然存在之類似物之實例包括（但不限於）胍肽核苷酸、鎖核酸（「LNA」）核苷酸（其含有雙環糖部分代替去氧核糖或核糖糖）、所述具有

不帶電之連接者（例如甲基膦酸酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺甲酸酯、等等）及帶有電之連接者（例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、等等）、與所述含有側基部分者。於特殊之實施方式中，該類似物係 4-乙醯基胞嘧啶、8-羥基-N6-甲基腺苷、吡口元基胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-(羧基羥基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、肌苷、N6-異戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鳥糞嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥糞嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥糞嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鳥糞嘌呤、5-甲基胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-胺基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基 queosine、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-異戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧醋酸甲酯、尿嘧啶-5-氧醋酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧醋酸甲酯、尿嘧啶-5-氧醋酸、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、與 2,6-二胺基嘌呤、或 7-去氫鳥苷。

【0053】 於一些實施方式中，該封阻劑包含至少二、至少三、或四種自然存在之核糖核苷酸之混合物。於其他實施方式中，該封阻劑包含至少二、至少三、或四種自然存在之去氧核糖核苷酸之混合物。於又其他實施方式中，該封阻劑包含至少二、至少三、四或甚至超過四種核苷酸類似物之混合物。於又其他實施方式中，該封阻劑包含以下者之混合物(a)自然存在之核糖核苷酸與自然存在之去氧核糖核苷酸、(b)自然存在之核糖核苷酸與核苷酸類似物(c)自然存在之去氧核糖核苷酸與核苷酸類似物；或(d)自然

存在之核糖核苷酸、自然存在之去氧核糖核苷酸與核苷酸類似物。

【0054】 用於該封阻劑之核糖核苷酸之量可與意欲與該珠粒撞擊系統一起使用之該樣本液之量匹配。於某些實施方式中，在將該樣本液加至該樣本管後溶解於該樣本液中之核糖核苷酸之濃度範圍在 200 pg/ml 至 20 µg/mL、1 ng/ml 至 15 µg/ml、或 1 µg/ml 至 10 µg/ml。因此，有關以上實施方式，如果 1 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之核糖核苷酸之量範圍會在 200 pg 至 20 µg、1 ng 至 15 µg、或 1 µg 至 10 µg（分別地），且如果 0.8 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之核糖核苷酸之量範圍會在 160 pg 至 16 µg、0.8 ng 至 12 µg、或 0.8 µg 至 8 µg。

#### 4.1.2.5 寡核苷酸

【0055】 可用作為封阻劑之寡核苷酸可自自然存在之來源合成或產生。

【0056】 於本文中提及之「寡核苷酸」並非表示該分子之尺寸且意謂任何長度之核苷酸之聚合形式。然而，典型地，寡聚物不大於 2,000 個核苷酸，1,000 個核苷酸，更典型地不大於 500 個核苷酸，且甚至更典型地不大於 250 個核苷酸。術語寡核苷酸包括雙股與單股 DNA 與 RNA（但較佳係至少部分單股）。其亦包括已知類型之修飾，例如，所屬技術領域中已知之標記、甲基化、「帽蓋」、以類似物取代所述自然存在之核苷酸之一或多者（諸如該等於第 4.1.2.4 節中描述者），諸如，例如。

【0057】 所述寡核苷酸可係不同尺寸之混合物及/或可包含核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、核苷酸類似物或以上者之二或多者之組合（例如核

糖核苷酸與去氧核糖核苷酸之混合物、核糖核苷酸與核苷酸類似物之混合物、去氧核糖核苷酸與核苷酸類似物之混合物、或核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、與核苷酸類似物之混合物)。於一些實施方式中，該封阻劑包含 RNA。

**【0058】** 可用於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之合成寡核苷酸典型係 2 至 120 個核苷酸長。於種種實施方式中，所述寡核苷酸係 2、5、8、10、15、18、25、40、50、80、100 或 120 個核苷酸長，或具有範圍介於以上值之任何配對之間之長度(例如 2 至 100 個核苷酸長、2 至 50 個核苷酸長、2 至 25 個核苷酸長、5 至 40 個核苷酸、2 至 15 個核苷酸長、8 至 120 個核苷酸長、8 至 80 個核苷酸長、10 至 100 個核苷酸長、15 至 50 個核苷酸長、50 至 100 個核苷酸長、100 至 120 個核苷酸長、與如此等等)之寡核苷酸。

**【0059】** 自然存在之寡核苷酸可藉由自一或多種自然存在之來源(例如鮭魚精子 DNA、小牛胸腺 DNA、鮭魚精子 DNA、或其等之組合)提取 DNA 來製備。

**【0060】** 用於該封阻劑之寡核苷酸之量可與意欲與該珠粒撞擊系統一起使用之該樣本液之量匹配。於某些實施方式中，在將該樣本液加至該樣本管後溶解於該樣本液中之寡核苷酸之濃度範圍在 200 pg/ml 至 20 µg/mL、1 ng/ml 至 15 µg/ml、或 1 µg/ml 至 10 µg/ml。因此，有關以上實施方式，如果 1 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之寡核苷酸之量範圍會在 200 pg 至 20 µg，1 ng 至 15 µg，或 1 µg 至 10 µg (分別地)，且如果 0.8 mL 之樣本欲被加至 2 mL 管，用於該封阻劑之核糖核苷酸之量範圍會在

160 pg 至 16 μg，0.8 ng 至 12 μg，或 0.8 μg 至 8 μg。

#### 4.1.3 珠粒

【0061】 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統包含當其等被佈置於該樣本液中時相對於彼此係可移動的珠粒。用於本文中，術語「珠粒」涵蓋球形與非球形顆粒兩者。所述珠粒可係礦物質珠粒，例如該等由結晶顆粒（例如鋯、鋯英石（矽酸鋯）與氧化鋯（二氧化鋯）、石英、氧化鋁、碳化矽（亦以金剛砂為人所知）、陶瓷顆粒、玻璃（例如二氧化矽玻璃或矽石）、或包含以上者之一或多者之組合（例如氧化鋯/矽石珠粒或氧化鋯/釷珠粒）構成。所述珠粒亦可係金屬珠粒，例如不銹鋼珠粒或鉻鋼珠粒。

【0062】 對於細菌 DNA 之回收，所述珠粒較佳包括石英顆粒及/或鋯顆粒。如此珠粒係商業上可以大量購得且對於 DNA 與 RNA 而言係化學惰性的。石英及/或鋯顆粒具有相對高之比重，係堅硬的且可具有銳邊。因此，其等在暴露至機械震動時極適合用於打開細胞膜。

【0063】 給定珠粒撞擊系統之珠粒之材料與尺寸可由所屬技術領域中具有通常知識者基於欲處理之液體樣本中之細胞類型為何而選擇。一般而言，所述珠粒直徑範圍會在 50 μm 至 3 mM。對於自細菌細胞萃取核酸，可使用小型至中等尺寸之珠粒，其等典型係由玻璃或鋯構成且直徑範圍在 50 μm 至 0.5 mM。對於自較大之微生物細胞（諸如酵母菌）萃取核酸，可使用中等尺寸或大型珠粒（例如具有之 0.5 mm、1 mm 或 1.5 mm 珠粒直徑之珠粒，其典型由玻璃或鋯構成）。用於處理不同細胞類型之不同尺寸與構成之珠粒係商業上可購得。參見（例如）Benchmark Scientific,

Product Note: Benchmark Bead Beating Guide，其可於  
[www.denvillescientific.com/sites/default/files/Bead\\_Blasting\\_Notes.pdf](http://www.denvillescientific.com/sites/default/files/Bead_Blasting_Notes.pdf)  
 獲得。

【0064】 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統可包括多種類型之珠粒及/或多種尺寸之相同類型之珠粒，尤其在自多種來源（例如細菌與真菌 DNA）回收核酸係所欲時。具有多種類型之珠粒之珠粒撞擊系統之實例包括具有氧化鋁珠粒及碳化矽珠粒之組合、陶瓷珠粒與矽石珠粒之組合、玻璃珠粒及氧化鋯珠粒之組合、氧化鋯珠粒與氧化鋁珠粒之組合、或碳化矽珠粒及玻璃珠粒之組合之系統。所述不同類型之珠粒可係相同或不同尺寸。

## 4.2 樣本

【0065】 自其核酸可使用本文之揭示內容之珠粒撞擊方法萃取之樣本之實例包括種種液體樣本。於一些實例中，該樣本可係來自受驗者之體液樣本。該樣本可包括自該受驗者收集之組織。該樣本可包括受驗者之體液、分泌物、及/或組織。該樣本可係生物樣本。該生物樣本可係體液、分泌物、及/或組織樣本。生物樣本之實例可包括（但不限於）血液、血清、唾液、尿液、胃液與消化液、眼淚、糞便、精液、陰道分泌物、源自腫瘤性組織之組織間隙液、眼液、汗液、黏液、耳垢、油、腺體分泌物、呼吸、脊髓液、毛髮、指甲、皮膚細胞、血漿、鼻拭子或鼻咽之洗液、脊髓液、腦脊液、組織、喉拭子、創傷拭子、生檢、胎盤液、羊水、臍帶血、增強液(emphatic fluid)、腔液、痰、膿或其他創傷滲出物、來自創傷清創或切除之經感染組織樣本、腦脊液、灌洗、白血球生成樣本、腹膜透析液、乳汁

及/或其他分泌物。

【0066】 該樣本可自受驗者置入珠粒撞擊管中或可在置於珠粒撞擊管中前已經歷一些類型之預處理（例如如於以下第 4.3 節中描述的）、儲存、或運送。該樣本可未經歷干擾或長時間就被加至珠粒撞擊系統。

【0067】 受驗者可提供樣本，且/或該樣本可自受驗者收集。受驗者可係人類或非人類動物。該樣本可自活或死受驗者收集。該動物可係哺乳類動物，諸如農場動物（例如母牛、豬、綿羊）、運動動物（例如馬）、或寵物（例如狗或貓）。該受驗者可係患者、臨床受驗者、或臨床前患者。受驗者可正經歷診斷、治療、及/或疾病治理或生活方式或預防性照護。該受驗者可或可不在健康照護專家之照護下。

【0068】 於一些實施方式中，該樣本可係環境樣本。環境樣本之實例可包括空氣樣本、水樣本（例如地下水、地表水、或廢水）、土壤樣本、或植物樣本。

【0069】 其他樣本可包括食物產品、飲料、製造材料、紡織品、化學品、治療、或任何其他樣本。

### 4.3 樣本預處理

【0070】 於一些實例中，在於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中處理前預處理樣本可能係有益的。可在將樣本置於珠粒撞擊管中前使用之預處理步驟之實例包括過濾、蒸餾、萃取、濃縮、離心、使干擾性組份失活、添加試劑、與類似者，如於本文中討論的或否則如所屬技術領域中已知的。

【0071】 以下者會係尤其有利的：在將不想要之細胞類型與微粒物質

置入本文之揭示內容之珠粒撞擊管中前自生物樣本移除其等以最大化 DNA 自所關注之細胞類型之回收。

【0072】 若想於生物樣本偵測細菌，則以下者係所欲的：通過過濾器預處理該生物樣本以使得微粒與非細菌細胞被保留在過濾器上而細菌細胞（包括其等之孢子，若所欲）通過。用於本文中，「過濾器」係膜或裝置，其允許顆粒與分子基於尺寸之差異性通過。典型地，此係藉由在過濾器中具有特殊標稱尺寸之孔洞來完成。例如，所特別關注之用於細菌偵測應用之過濾器具有孔洞，其等足夠大以允許所關注之樣本中存在之細菌通過但足夠小以預防真核細胞通過。一般而言，細菌細胞直徑範圍在 0.2 至 2  $\mu\text{m}$ （微米或微公尺），大多數真菌細胞直徑範圍在 1 至 10  $\mu\text{m}$ ，血小板直徑係大約 3  $\mu\text{m}$  且大多數有核哺乳類動物細胞直徑典型係 10 至 200  $\mu\text{m}$ 。因此，若意欲偵測細菌，小於 2  $\mu\text{m}$  或小於 1  $\mu\text{m}$  之過濾器孔洞尺寸係尤其適合用於自生物樣本移除非細菌細胞。

【0073】 除了或替代過濾步驟，生物樣本可在珠粒撞擊前經受離心以自樣本移除細胞與殘骸。沈澱真核細胞但不沈澱細菌細胞之離心參數係所屬技術領域中已知的。若所欲，上清液可接著被過濾。

【0074】 由過濾步驟產生之濾液可係「樣本」且可被置入根據本文之揭示內容之珠粒撞擊管中，或經受進一步預處理步驟（例如濃縮或稀釋）。

#### 4.4 珠粒撞擊

【0075】 作為核酸製備中之初步步驟，樣本被放置至珠粒撞擊管中以供珠粒撞擊。該珠粒撞擊步驟可利用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統或標

準珠粒撞擊系統。於一些實例中，當使用標準珠粒撞擊系統時，可添加一或多種外源性封阻劑，但如果生物樣本含有內源性封阻劑，添加外源性封阻劑並非必須。當添加一或多種封阻劑時，其等可於添加該樣本前或於添加該樣本後加至珠粒撞擊管、或該樣本與該封阻劑兩者可被同時添加（例如，該樣本與該封阻劑可被混合並接著轉移至珠粒撞擊管）。

**【0076】** 於將該樣本放置於該珠粒撞擊管中後，該管經受攪動以機械性地溶胞所述細胞。溶胞可藉由一般實驗室渦旋機或均質機達成。雖然於渦旋機之處理時間比於專業均質機者長 3-10 倍，渦旋可輕易地瓦解細胞且係不昂貴的。

**【0077】** 許多適合用於珠粒撞擊之均質機係商業上可購得的且可與本文之揭示內容之撞擊撞擊系統一起使用。例示性均質機係 BeadBug 與 BeadBlaster 24 (Benchmark Scientific)、PowerLyzer 24 (MO Bio Laboratories Inc.)、FastPrep-24、FastPrep-24 5G 與 SuperFastPrep-1 (MP Biomedicals)、及 Mini-BeadBeater-16 (BioSpec Products)。

**【0078】** 均質化參數可根據製造商之建議選擇。一般而言，機械瓦解（例如珠粒撞擊）之持續時間可係小於 1 秒、1-5 秒、5-10 秒、10-25 秒、25-60 秒、1 分鐘-2 分鐘、2 分鐘-5 分鐘、5 分鐘或更長。機械瓦解（例如珠粒撞擊時段之次數）之重複次數可係 2、3、4、5、6、7、7-10、10 或更多次重複。瓦解之速率（例如珠粒撞擊之速率或設置）可係少於 50、50-100、100-250、250-500、500-750、750-1000、1000-1500、1500-2000、2000 或更多次旋轉（振盪）每分鐘。

## 4.5 核酸純化

【0079】 於細胞溶胞後，該液體樣本係自所述珠粒分離，例如藉由使用移液管或類似者自該樣本管移出該液體樣本，留下所述珠粒，其等沈澱在該樣本管之底部。

【0080】 可能干擾所萃取之 DNA 之分析之雜質可被移除，例如藉由透過已知的方法沈澱所述雜質，諸如使用醋酸銨或使用商業性套組。

【0081】 核酸可被回收並洗滌並視需要地進一步純化。核酸之回收及/或純化可使用習用方法實現，諸如藉由以異丙醇沈澱或使用商業性套組或自動化儀器。

## 4.6 核酸分析

【0082】 針對所關注之核酸（諸如細菌或真菌 DNA）之存在之樣本分析可使用任何核酸分析方法執行，該方法包括（但不限於）擴增技術、聚合酶連鎖反應（PCR）、等溫擴增、反轉錄聚合酶連鎖反應（RT-PCR）、定量性即時聚合酶連鎖反應（Q-PCR）、數位 PCR、凝膠電泳、毛細管電泳、質譜法、螢光偵測、紫外光譜法、雜交分析、DNA 或 RNA 定序、限制分析、反轉錄、NASBA、對偶基因專一性聚合酶連鎖反應、聚合酶循環組裝（PCA）、不對稱聚合酶連鎖反應、指數後線性聚合酶連鎖反應（LATE-PCR）、解旋酶依賴性擴增（HDA）、熱起始聚合酶連鎖反應、序列間專一性聚合酶連鎖反應（ISSR）、反向聚合酶連鎖反應、連接介導性聚合酶連鎖反應、甲基化專一性聚合酶連鎖反應（MSP）、多路聚合酶連鎖反應、巢式聚合酶連鎖反應、固相聚合酶連鎖反應、或任何其等之組合。如此技

術對所屬技術領域中具有通常知識者而言係廣為人知的。知道目標核酸之序列會使科學家能夠構築允許目標之擴增及/或偵測之引子及/或探針。PCR 擴增物亦可被定序以確認其等為何。

【0083】 使用根據本文之揭示內容之珠粒撞擊系統，以下者是可能的：使用本身已知的方法以足以直接微生物地檢查 DNA 及/或 RNA 之濃度自該樣本液中所含之微生物萃取該 DNA 及/或 RNA。此尤其可藉由以下者發生：將該樣本液與固定在表面上之受體接觸，所述受體專一性地與該 DNA 及/或 RNA 結合及/或與其中所含之 DNA 及/或 RNA 組份結合。該 DNA 及/或 RNA 及/或 DNA 及/或 RNA 組份與所述受體之結合可使用本身已知的方式以標誌（特別是光學標誌，諸如螢光染料）偵測，且若需要定量。供選擇地，來自該樣本液中所含之微生物之 DNA 及/或 RNA 可於檢查前被擴增（例如藉由 PCR）。

#### 4.7 套組

【0084】 本文之揭示內容進一步提供含有（或適合用於獲得）本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之套組。所述套組可包含樣本管（諸如於第 4.1.1 節中描述之樣本管）、一或多種或封阻劑（諸如所述於第 4.1.2 節中描述者）、及/或一或多種類型之珠粒（諸如所述於第 4.1.3 節中描述者）。該一或多種封阻劑之各者可經預冷凍乾燥且可被包含在該管內或與該管分開。同樣地，所述珠粒可被包含在該管內或與該管分開。

【0085】 於一些實施方式中，該套組包含樣本管與一或多種封阻劑。於進一步之實施方式中，該套組進一步包含一或多種類型之珠粒。

【0086】 本文之揭示內容之套組可包括一或多種用於樣本預處理之組份，例如鹽水、一或多緩衝液溶液、過濾器（如於第 4.3 節中描述的）、等等。

【0087】 所述套組可包括一或多種用於擴增來自一或多種例如以下者之一或多者之所關注之病原體之 DNA 及/或 RNA 之寡核苷酸：結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、鳥分枝桿菌副結核亞種 (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌 (MRSA)、釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、流行性感感冒嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血桿菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、卡他摩氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎克雷氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、不動桿菌屬 (*Acinetobacter*) 物種、百日咳博德氏桿菌 (*Bordetella pertussis*)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*)、炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*)、奴卡氏菌屬 (*Nocardia*) 物種、放線菌屬 (*Actinomyces*) 物種、肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎披衣菌 (*Chlamydia pneumoniae*)、退伍軍人桿菌屬 (*Legionella*) 物種、傑氏肺囊蟲 (*Pneumocystis jiroveci*)、A 型流行性感感冒病毒、細胞巨大病毒、鼻病毒、屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*)、無黴菌酸棒狀桿菌 (*Corynebacterium amycolatum*)、產氣腸桿菌 (*Enterobacter aerogenes*)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) CI 4413、萎垂沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、馬鏈球菌 (*Streptococcus equi*)、與白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

【0088】 所述套組可包括一或多種用於偵測來自一或多種例如以下者之一或多者之所關注之病原體之 DNA 及/或 RNA 之探針：結核分枝桿菌、鳥分枝桿菌副結核亞種、金黃色葡萄球菌、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌（MRSA）、釀膿鏈球菌、肺炎鏈球菌、無乳鏈球菌、流行性感嗜血桿菌、副流感嗜血桿菌、卡他摩氏菌、肺炎克雷氏菌、大腸桿菌、銅綠假單胞菌、不動桿菌屬物種、百日咳博德氏桿菌、腦膜炎雙球菌、炭疽桿菌、奴卡氏菌屬物種、放線菌屬物種、肺炎黴漿菌、肺炎披衣菌、退伍軍人桿菌屬物種、傑氏肺囊蟲、A 型流行性感病毒、細胞巨大病毒、鼻病毒、尿腸球菌、鮑氏不動桿菌、無黴菌酸棒狀桿菌、產氣腸桿菌、糞腸球菌 CI 4413、萎垂沙雷氏菌、馬鏈球菌、與白色念珠菌。於實施方式中，該一或多種探針包含以螢光染料標記之寡核苷酸。不同之探針可以不同之染料標記以使同時偵測多種所關注之病原體成為可能。

## 5.例示性珠粒撞擊系統

【0089】 例示性珠粒撞擊系統係於圖式中顯示。於圖 1 至 3 中以符號 (1) 稱呼之珠粒撞擊系統包含樣本管 (2)，其具有內腔 (3) 與可封閉之孔洞 (4)。該樣本管較佳係由塑膠構成，但亦可由另一生物惰性材料構成。

【0090】 樣本液 (5)（其被假定為含有微生物）可通過該孔洞 (4) 充至該樣本管 (2) 之內腔 (3) 中與自其移出。對於關閉該孔洞 (4)，該樣本管具有封閉物 (6)，其適用於搬至開放位置與封閉位置且被設計成封閉蓋，其包含內螺紋，其適用於旋擰至由該樣本管 (2) 之外壁之邊緣區域提供之外螺紋，其與該孔洞 (4) 結合。

【0091】 於該內腔(3)中，珠粒(7)（例如 2 克之二氧化矽及/或鋳珠粒）被進一步佈置，其最大尺寸平均係大約 100  $\mu\text{m}$ 。所述珠粒(7)可以鬆散之團塊之形式獲得，於其中其等相對於彼此係可移動的。冷凍乾燥封阻劑(8)亦被佈置於該內腔(3)中。

【0092】 當該樣本液(5)被充至該內腔(3)中且該珠粒撞擊管經受機械振盪（例如超音波振盪）時，所述珠粒(7)有用於機械性地破壞該樣本液(5)中所含之微生物之細胞壁。其等可以未於圖式中以細節闡明之振盪產生器產生且可轉傳至該珠粒撞擊系統(1)。如此振盪產生器係商業上可自 MP Biomedicals 以 MPBio 珠粒撞擊器之名購得。由於細胞壁之破壞，所述微生物中所含之核酸（例如 DNA）被釋放並溶解於該樣本液(5)中。

## 6.實例研究

### 6.1 使用珠粒撞擊以自痰回收病原體 DNA

【0093】 結核分枝桿菌（「MTB」）係分枝桿菌科之絕對病原性細菌物種且係大部分肺結核病例之病因。主要為哺乳類動物呼吸系統之病原體，其感染肺臟。證據暗示分枝桿菌在例如營養不足或缺氧之壓力期間能夠進入非複製或休眠（孢子形成）狀態。孢子之形成使溶胞細菌細胞以萃取細菌 DNA 有挑戰。

【0094】 進一步使分枝桿菌 DNA 之回收複雜化者係分枝桿菌屬品系典型係自受感染之患者之痰分離。痰係濃稠的且難以處理的。大多數用於分析之痰樣本含有種種量之有機殘骸與各種各樣之污染、正常、或短時間細菌叢。典型使用化學淨化/處理以減少黏性並殺死污染物同時允許分枝桿

菌之回收。

【0095】 被懷疑含有 MTB 之樣本對使用者而言有潛在風險。因此，痰樣本可藉由加熱及/或納入適合用於使該樣本中存在之微生物失活之試劑來預處理以減輕此風險。使微生物（諸如 MTB）失活可藉由以下者實現：加熱（例如 90 °C，5 min.）以變性活性蛋白質、酵素性消化細胞壁結構、機械瓦解以物理上地瓦解細胞或使細胞失活、化學處理或其等之組合。

【0096】 對於一致之樣本處理，痰樣本（典型係以介於 1-10 mL、5-10 mL 或更大之體積收集）可經初步液化以減少其之黏性與非均質性。痰樣本造成特別之挑戰。於痰中之 MTB 係最具挑戰性之欲處理之細胞與樣本類型之一，其係由於該耐酸性桿菌之富含脂質之疏水性細胞壁與痰之黏性非均質性質。用於痰之標準萃取方法典型以沉澱處理之程序開始，其往往包含以黏液分解劑（諸如 N-乙醯基-L-半胱胺酸（NALC）、殺藻胺（zephiran）-磷酸三鈉（Z-TSP）、或殺藻胺（benzalkonium））處理接著離心、傾析、與再懸浮。

【0097】 因此，當處理高黏性樣本（諸如痰）時，可使該樣本經受化學處理以減低黏性以使得隨後之處理步驟）不被妨礙。於實施方式中，痰樣本透過使用黏液分解劑之化學處理之液化係於 60 °C 下實現 20 分鐘。痰具有範圍在約 100-6,000 cP（mPas）之黏性與於 90 s<sup>-1</sup> 之剪率。黏性（其以 mPas 測量）係由抗剪強度除以剪率來決定。較佳地，該樣本被液化以減低痰之黏性達至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 99%。

【0098】 於再懸浮後，該樣本被加至本文之揭示內容之珠粒撞擊系統

（如於第 4.1 節中描述的）以溶胞細胞，如於第 4.4 節中描述的。於溶胞與核酸萃取（參見第 4.5 節）後，MTB DNA 可藉由 PCR 擴增 MTB 序列來分析且 MTB 藥物抗性可藉由擴增藥物抗性基因來分析。可針對包括（但不限於）以下者之其他細菌與病毒病原體分析痰樣本：金黃色葡萄球菌、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌（MRSA）、釀膿鏈球菌、肺炎鏈球菌、無乳鏈球菌、流行性感嗜血桿菌、副流感嗜血桿菌、卡他摩氏菌、肺炎克雷氏菌、大腸桿菌、銅綠假單胞菌、不動桿菌屬物種、百日咳博德氏桿菌、腦膜炎雙球菌、炭疽桿菌、奴卡氏菌屬物種、放線菌屬物種、肺炎黴漿菌、肺炎披衣菌、退伍軍人桿菌屬物種、傑氏肺囊蟲、A 型流行性感病毒、細胞巨大病毒、與鼻病毒。

## 6.2 使用珠粒撞擊以自獸醫病原體回收 DNA

【0099】 鳥分枝桿菌副結核亞種（MAP）係獸醫病原體，其係造成副結核病或 Johne 氏病（JD）（家養與野生反芻動物中之慢性肉芽腫胃腸炎）之原由。MAP 於畜群中係透過精液、乳汁、初乳與子宮內直接傳播與透過受污染之飼料、秣料、牧草、水等等藉由口途徑（糞口途徑）間接傳播。JD 對家畜生產力有毀滅性影響（早熟淘汰與乳汁生產減少）與家畜產業招致巨大之經濟損失。JD 控制工作已被 MAP 在土壤與水中之持續存在以及由亞臨床與臨床家畜之放出妨礙。

【0100】 如於之前之章節中提及的，孢子之形成使得溶胞分枝桿菌細胞以萃取細菌 DNA 有挑戰性。因此，本文之揭示內容之珠粒撞擊系統可用於改善 MAP 回收。例如，所述珠粒撞擊系統可用於自於乳汁、土壤、排泄

物、精液、等等中存在之 MAP 回收 DNA。

【0101】 乳汁樣本可使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統直接處理或可經預處理，例如以增加該樣本中之 MAP（若存在）之濃度。例示性預處理方法包含離心乳汁之樣本以提供乳油份、乳清份、與沈澱小丸。該乳油份與該沈澱小丸可被倒在一起並加至本文之揭示內容之珠粒撞擊系統以用於溶胞細胞。

【0102】 糞樣本可經預處理，例如藉由製備糞懸浮液，其可接著被加至本文之揭示內容之珠粒撞擊系統以用於溶胞細胞。例示性糞懸浮液可藉由以下者製備：混合糞樣本與水、鹽水或緩衝液（例如磷酸鈉、經磷酸鹽緩衝之鹽水、Tris、等等），允許該混合物澄清，分離並接著離心上清液，與最後將沈澱小丸再懸浮於適合之液體（諸如水、鹽水、或緩衝液）中。

【0103】 土壤樣本可被懸浮於液體（例如水、鹽水、或緩衝液）中並接著加至本文之揭示內容之珠粒撞擊系統以用於溶胞。精液樣本可於珠粒撞擊前藉由將精液樣本與某量之水、鹽水、或緩衝液結合在一起來類似地預處理。

### 6.3 使用珠粒撞擊以自創傷回收病原體 DNA

【0104】 對於創傷感染之偵測，可將創傷拭子培養於鹽水之溶液、細胞培養培養基、或來自商業性套組之樣本製備溶液中。該拭子典型被培養一段大約 5 分鐘 - 1 個小時且更佳係 0.25 - 1 個小時（例如 0.25 個小時、0.5 個小時或 0.75 個小時）之時期。溶液之適合體積係 200  $\mu$ L 至 10 mL 且特別之實施方式係 500  $\mu$ L、1 mL、2 mL、5 mL、8 mL 或選自邊界為以上實施

方式之任二者之範圍(例如 1 mL 至 5 mL、500  $\mu$ L 至 10 mL、200  $\mu$ L 至 8 mL、與如此等等。該溶液可被週期性地搖動或攪動以促進病原性細胞自該拭子釋放。於培養時期之最後，該拭子可被擠擰並丟棄。

【0105】 該溶液可接著被置於本文之揭示內容之珠粒撞擊系統中。視需要地，其在珠粒撞擊前被過濾及/或濃縮。

【0106】 一般感染創傷之病原體包括(但不限於)大腸桿菌、銅綠假單胞菌、屎腸球菌、金黃色葡萄球菌(包括 MRSA)、肺炎克雷氏菌、鮑氏不動桿菌、無黴菌酸棒狀桿菌、產氣腸桿菌、糞腸球菌 CI 4413、萎垂沙雷氏菌、馬鏈球菌與白色念珠菌。因此，可針對以上生物體之任一者(單一或組合)分析創傷拭子樣本。

#### 6.4 使用珠粒撞擊以自腹膜透析液回收病原體 DNA

【0107】 腹膜透析係用於患有嚴重慢性腎臟疾病之患者之治療。此類型之透析使用患者腹部中之腹膜作為跨越其液體與溶解物質自血液交換之膜。液體透過於腹部之固定管導入並接著洗出以清除過多之鹽、尿酸與其他廢物。藉由跨越腹膜之滲透，溶質係於血液與透析液間交換。在一適合之時間後，該透析液被自腹膜移除並丟棄。以此方式，血液變得平衡且終端代謝產物(諸如尿酸)於血液中之無限堆積被預防。

【0108】 腹膜透析之主要併發症係導因於腹部中之固定管之存在之感染。至少感染位置係於腹膜空間中，導致腹部疼痛、渾濁之透析排出液與在格蘭氏染色或於來自導管內之培養物上找到病原體。進一步，組織通道或該導管之外表面係來自接觸污染之一般感染點。於組織通道之感染最

常係由於自皮膚位置之移動。感染可導致腹膜炎且於一些病例導致死亡。

【0109】 腹膜感染可於自經歷腹膜透析之個體移出之腹膜透析液中偵測。雖然金黃色葡萄球菌與銅綠假單胞菌係大多數感染之原由，亦可涉及其他細菌（類白喉菌、厭氣性生物體、非發酵性細菌、鏈球菌、非結核性分枝桿菌、退伍軍人桿菌屬、酵母菌、與真菌）。因此，可針對以上生物體之任一者（單一或組合）分析腹膜透析液樣本。

【0110】 腹膜透析液可藉由過濾與視需要地濃縮預處理，如於第 4.3 節中描述的。

## 6.5 使用珠粒撞擊以自廢水污染物回收 DNA

【0111】 美國專利編號 9,290,796(其係針對於生物廢水處理過程中偵測造成問題之成泡與膨大細菌物種)之實施例 1 描述使用珠粒撞擊方案自廢水處理工廠收集之廢水萃取 DNA。該珠粒撞擊方案可適用於併入本文之揭示內容之珠粒撞擊系統。

## 6.6 使用珠粒撞擊以自食物病原體回收 DNA

【0112】 液體食物樣本可於珠粒撞擊前藉由過濾及/或離心預處理，如於以上第 4.3 節中描述的。例如，飲料較佳可藉由過濾預處理以收集可能出現之微生物。藉由過濾收集之微生物可於珠粒撞擊前視需要地洗滌與經受離心。關於從固體食物（諸如肉或魚）偵測病原體，該食物之樣本可被擦拭以自該食物之表面收集微生物。所述微生物可接著自該拭子洗出並接著經受珠粒撞擊。

【0113】 於一些實例中，以下者可係所欲的：預培養食物樣本一段時間以於珠粒撞擊前促進可能存在於該樣本上或內之病原體（例如沙門氏桿菌屬（*Salmonella*））之生長。例如，固體食物樣本可使用實驗室混合器（例如 Stomacher®循環器，Seward Limited，英國）磨碎並接著培養以促進微生物生長（例如共 8 至 12 小時）。該培養物之樣本可接著經受珠粒撞擊。

## 6.7 使用珠粒撞擊以自血液回收病原體 DNA

【0114】 針對人類感染之快速分子診斷測試之開發係世界衛生組織於改善世界人口之健康之最高優先（Daar 等人，2002, *Nat. Genet.* 32:229-232）。嚴重血液感染係全世界住院治療之患者發病與死亡之一重要原因與重症加護之最重要挑戰之一。例如，於美國之最近之敗血症發生率之估計係每 100 000 個病例 240 個病例。敗血症之人類與經濟負擔係相當大的（Grossi 等人，2006, *Surg. Infect. (Larchmt)* 7:S87-S91）。儘管於感染性疾病與重症加護治理有進展且有為數眾多之開發新治療之嘗試，敗血症死亡率仍然係無法接受地高，範圍在 20%至 50%。識別嚴重血液感染及/或嚴重敗血症之徵候並作出早期且正確之診斷係改良照護與增加存活率之關鍵。確實，快速診斷可藉由減少介於取樣血液與施用抗微生物治療之間之時間間隔而增加患者存活。

【0115】 對於偵測病原體之分子技術（例如 PCR 與 DNA 序列分析），病原體 DNA 之適當分離對於確保成功之偵測而言係關鍵性的。種種方法使用溶胞緩衝液，有時伴隨著物理瓦解方法（諸如珠粒撞擊）以改良病原體 DNA 自血液之回收。

【0116】 本文之揭示內容利用血液中之自然存在之封阻劑之存在並提供用於自血液分離病原體 DNA 之簡化方法。該血液可在不被任何緩衝液或其他添加劑稀釋下使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統（含有封阻劑之）或傳統珠粒撞擊系統（缺少封阻劑）經受珠粒撞擊。於珠粒撞擊後，可使用標準方法以回收病原體 DNA，諸如所述於第 4.5 節中描述者。視需要地，所回收之病原體 DNA 接著被分析，例如藉由所述於第 4.6 節中描述之方法。

【0117】 造成敗血症之病原體典型係細菌或真菌。敗血症之一般細菌病因係革蘭氏陰性桿菌（例如大腸桿菌、銅綠假單胞菌、嚙蝕 *Eikenella* 氏菌（*E. corrodens*）、與流行性感感冒嗜血桿菌）。其他亦會造成敗血症之細菌係金黃色葡萄球菌、鏈球菌屬（*Streptococcus*）物種、腸球菌屬（*Enterococcus*）物種與奈瑟氏球菌屬（*Neisseria*）。念珠菌屬（*Candida*）物種係最常見之造成敗血症之真菌中之一些。因此，可針對以上生物體之任一者（單一或組合）分析血液樣本。

## 7.實施例

### 7.1 實施例 1：珠粒撞擊系統造成 DNA 損失

#### 7.1.1 材料

【0118】 於此研究中使用之材料係：

【0119】 珠粒撞擊管：件號：ARY0007 OPS Diagnostics，4.5 mL 冷凍小瓶，具有 2.0 gm 之 100  $\mu$ m SiO<sub>2</sub> 珠粒。

【0120】 PD 液：含有葡萄糖與 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>之平衡之腹膜透析液。

【0121】 BE 緩衝液：Taigen Bioscience。含有 1  $\mu$ g 之 RNA/ $\mu$ l。

【0122】 尿素：ACS 級

### 7.1.2 方法

【0123】 以 10 mM 之水平摻加 EDTA 且以 5000 CFU/mL 摻加白色念珠菌之二(2) mL 之 PD 液係標準基質。十二(12)種尿素與 BE 緩衝液之不同組合被加至該樣本，如於以下表 1 中所示：

| 表 1：樣本 |                              |            |          |
|--------|------------------------------|------------|----------|
| 樣本編號   | 樣本                           | BE 緩衝液     | 尿素       |
| 1      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 0        |
| 2      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 30 $\mu$ l | 0        |
| 3      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 75 $\mu$ l | 0        |
| 4      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 23.3 g/L |
| 5      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 30 $\mu$ l | 23.3 g/L |
| 6      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 2.3 g/L  |
| 7      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 30 $\mu$ l | 2.3 g/L  |
| 8      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 0.23 g/L |
| 9      | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 30 $\mu$ l | 0.23 g/L |
| 10     | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 23.3 g/L |
| 11     | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 30 $\mu$ l | 23.3 g/L |
| 12     | PD 液+ EDTA+5000 CFU/mL 白色念珠菌 | 0          | 2.3 g/L  |

【0124】 所有樣本被珠粒撞擊共 45 秒。於珠粒撞擊後，使用 LabTurbo® 48 核酸萃取系統（Taigen Bioscience Corporation，台北，台灣）使用製造商之試劑與方案自所述樣本分離 DNA。於 100  $\mu$ l 之 TE（Tris EDTA）緩衝液中洗提從 2.0 mL 之各個珠粒撞擊樣本分離之 DNA。使所分離之 DNA 經受即時 PCR 擴增與定量以測定各個樣本中目標 DNA 之量。

### 7.1.3 結果

【0125】 各個樣本之光學密度比率（其係所分離之 DNA 之純度之指標）與相對應 DNA 濃度係於以下表 2 中顯示：

| 表 2：DNA 回收 |        |          |           |                |
|------------|--------|----------|-----------|----------------|
| 樣本編號       | BE 緩衝液 | 尿素       | A260/A280 | DNA 濃度 (ng/μL) |
| 1          | 0      | 0        | 1.97      | 5.5            |
| 2          | 30 μl  | 0        | 3.02      | 54             |
| 3          | 75 μl  | 0        | 3.16      | 125            |
| 4          | 0      | 23.3 g/L | 2.45      | 18.7           |
| 5          | 30 μl  | 23.3 g/L | 3.09      | 53             |
| 6          | 0      | 2.3 g/L  | 2.53      | 22             |
| 7          | 30 μl  | 2.3 g/L  | 2.97      | 48.7           |
| 8          | 0      | 0.23 g/L | 2.81      | 22.2           |
| 9          | 30 μl  | 0.23 g/L | 3.05      | 51             |
| 10         | 0      | 23.3 g/L | 2.95      | 14.4           |
| 11         | 30 μl  | 23.3 g/L | 3.01      | 56             |
| 12         | 0      | 2.3 g/L  | 2.93      | 22             |

【0126】 以於 PCR 擴增與雜交後從成像來自該陣列之訊號獲得之訊號強度反映之 DNA 之產率獲得係於圖 6 與圖 7 以圖闡明。

#### 7.1.4 結論

【0127】 於樣本 1 (不含封阻劑)，白色念珠菌 DNA 之回收僅僅係 5.5 ng/mL。包含尿素作為封阻劑增加回收 3-4 倍且包含 RNA 作為封阻劑增加回

收大約 10-20 倍，且產率接近理論最大值。此回收之增加造成白色念珠菌 PCR 基因擴增之改良。

## 7.2 實施例 2：使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統萃取 DNA

### 7.2.1 本文之揭示內容之珠粒撞擊系統之製備

【0128】 於 TE (Tris/EDTA) 緩衝液中製備包含 250 mg/mL 尿素、25 mg/mL 乙二胺四酸 (EDTA) 之四鈉鹽、125 mg/mL 腺苷單磷酸、125 mg/mL 鳥苷單磷酸、125 mg/mL 胞嘧啶單磷酸、125 mg/mL 胸苷單磷酸與 75 mg/mL 月桂醯肌胺酸鈉之儲備封阻劑溶液。

【0129】 將 200 微升之該儲備溶液加至 4.5-至 5-mL 樣本管並藉由真空乾燥，得到沈澱於該樣本管之內壁之較低區域中之乾燥封阻劑。預期該乾燥封阻劑於至少一年內會係穩定的。

【0130】 接著將 2.0 克之 100 微米二氧化矽珠粒加至該樣本管。

### 7.2.2 使用本文之揭示內容之珠粒撞擊系統

【0131】 通過 0.4 微米無菌過濾器過濾 6 mL 之尿液與 6 mL 之腹膜透析液並接著將生長於培養實驗室中之 10,000 菌落形成單位每毫升之金黃色葡萄球菌加至該尿液濾液與該腹膜透析液濾液。

【0132】 將 2.9 mL 之經摻加尿液與 2.9 mL 之經摻加腹膜透析液轉移至如於第 7.2.1 節中描述地製備之樣本管或加至含有 2.0 克之 100 微米二氧化矽珠粒但缺少該封阻劑之樣本管。

【0133】 蓋上該管並將其夾在 MPBio 珠粒撞擊器中並以全功率運行

30 秒。移除帽蓋並放置在商業 DNA 分離裝置之樣本架上。自各管取出 2 mL 之各樣本並接著添加 DNA 萃取劑 (LabTurbo®)。接著執行 DNA 萃取。對各個樣本獲得 100 微升之 DNA 萃取物。

【0134】 於各個樣本中所萃取之金黃色葡萄球菌 DNA 之量係藉由即時聚合酶連鎖反應根據以下者測定：Gillespie、等人，2005, “Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction,” J. Dairy Sci. 88:3510 – 3518。於 20 微升反應中擴增 1 微升之各個 DNA 萃取物。

【0135】 使用缺少該封阻劑之樣本管處理之樣本對於尿液具有 32 之循環閾值且對於腹膜透析液具有 38 之循環閾值，顯示低 DNA 回收。

【0136】 使用具有該封阻劑之樣本管處理之樣本對於尿液具有 31 之循環閾值且對於腹膜透析液具有 32 之循環閾值，顯示在此等條件下對於腹膜透析液有改良之回收。

### 7.3 實施例 3：血液作為封阻劑

#### 7.3.1 縱述

【0137】 執行此研究以鑑認用於血液樣本之最理想珠粒撞擊條件。以病原體金黃色葡萄球菌、大腸桿菌與白色念珠菌摻加培養陰性血液樣本。進行陽性 PCR 對照組。將此對照組之濃度（基因體複本）設成所導入病原體之理論 100%回收。此研究展現在添加劑（諸如緩衝液、清潔劑、等等）不存在下使用珠粒撞擊自血液病原體萃取 DNA 係可能的。

### 7.3.2 材料

【0138】 此研究中特別使用之材料係：

【0139】 珠粒撞擊管：件號：ARY0007 OPS Diagnostics，4.5 mL 冷凍小瓶，具有 2.0 gm 之 100  $\mu$ m SiO<sub>2</sub> 珠粒。

【0140】 血液：培養陰性，來自健康捐贈者

【0141】 金黃色葡萄球菌、大腸桿菌與白色念珠菌培養物：皆來自 ATCC

### 7.3.3 方法

【0142】 製備一連串之三十八(38)個經摻加之血液樣本，其等由 3.0 mL 之血液與 15  $\mu$ L 含有經培養病原體之鹽水培養液組成。除了該含有經培養病原體之鹽水培養液外無物被加至各個血液樣本。使用 FastPrep®-24 均質機(MP Biomedicals)以 6.5 m/s 之速率處理該撞擊管。接著使用 LabTurbo® 48 核酸萃取系統(Taigen Bioscience Corporation)使用製造商之試劑與方案自所述樣本分離 DNA。以 55 個循環之 PCR 擴增 DNA 並與陣列雜交，接著洗滌與成像。病原體之量與珠粒撞擊時間係於以下表 3 顯示：

| 表 3：樣本 |                         |         |    |
|--------|-------------------------|---------|----|
| 樣本編號   | 樣本                      | 珠粒/管子   | 時間 |
| 1      | 血液/無摻加                  | OPS/OPS | 45 |
| 2      |                         |         |    |
| 3      | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | OPS/OPS | 45 |
| 4      |                         |         |    |
| 5      | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | OPS/OPS | 50 |
| 6      |                         |         |    |
| 7      | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | OPS/OPS | 55 |
| 8      |                         |         |    |
| 9      | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | OPS/OPS | 60 |
| 10     |                         |         |    |
| 11     | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | OPS/OPS | 65 |
| 12     |                         |         |    |
| 13     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | OPS/OPS | 45 |
| 14     |                         |         |    |
| 15     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | OPS/OPS | 50 |
| 16     |                         |         |    |
| 17     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | OPS/OPS | 55 |
| 18     |                         |         |    |
| 19     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | OPS/OPS | 60 |

| 表 3：樣本 |                         |             |    |
|--------|-------------------------|-------------|----|
| 樣本編號   | 樣本                      | 珠粒/管子       | 時間 |
| 20     |                         |             |    |
| 21     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | OPS/OPS     | 65 |
| 22     |                         |             |    |
| 23     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | OPS/OPS     | 45 |
| 24     |                         |             |    |
| 25     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | OPS/OPS     | 50 |
| 26     |                         |             |    |
| 27     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | OPS/OPS     | 55 |
| 28     |                         |             |    |
| 29     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | OPS/OPS     | 60 |
| 30     |                         |             |    |
| 31     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | OPS/OPS     | 65 |
| 32     |                         |             |    |
| 33     | 血液+ 5000 CFU/mL 白色念珠菌   | MPBio/MPBio | 60 |
| 34     |                         |             |    |
| 35     | 血液+ 5000 CFU/mL 金黃色葡萄球菌 | MPBio/MPBio | 60 |
| 36     |                         |             |    |
| 37     | 血液+ 100000 CFU/mL 大腸桿菌  | MPBio/MPBio | 60 |
| 38     |                         |             |    |

【0143】 對於在給定摻加水平之該三種不同之病原體，計算來自該 DNA 分離之每  $\mu\text{l}$  基因體出產。將此基因體複本值用作為 100%效率目標。

### 7.3.4 結果

【0144】 結果係於圖 8 至 10 以圖闡明，其等顯示以於 PCR 擴增與雜交後從成像來自該陣列之訊號獲得之訊號強度反映之 DNA 產率。圖 8 呈現白色念珠菌時間系列以及 100%目標。圖 9 呈現金黃色葡萄球菌時間系列以及 100%目標。圖 10 呈現大腸桿菌時間系列以及 100%目標。

### 7.3.5 結論

【0145】 對於該三種不同之病原體，並無由病原體 DNA 與所述珠粒結合造成之訊號喪失之證據。於所有實施例中，至少 100%之理論值被展現。於 2 個實施例中，高過 100%被回收，其可能係由於來自摻加物中之死細菌之 DNA 之存在。

## 8.特殊實施方式

【0146】 本文之揭示內容係藉由以下特殊實施方式例示。

1.一種珠粒撞擊系統，其包含(i)樣本管，其具有可透過孔洞進入的內腔、(ii)珠粒、與(iii)乾封阻劑，其中所述珠粒與乾封阻劑係置於該樣本管之內腔內。

2.根據實施方式 1 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種離散

劑、肌酐、一或多種核苷酸、一或多種寡核苷酸、或其等之組合。

3.根據實施方式 2 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種離散劑，包含尿素、一或多種胍鹽、一或多種鋰鹽、一或多種鎂鹽、一或多種清潔劑、或其等之組合。

4.根據實施方式 3 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種胍鹽，包含異氰酸胍、氯化胍、或其等之組合。

5.根據實施方式 3 或實施方式 4 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種鋰鹽，包含過氯酸鋰、醋酸鋰、或其等之組合。

6.根據實施方式 3 至 5 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含氯化鎂。

7.根據實施方式 3 至 6 中之任一者之撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種清潔劑，包含十二烷基硫酸鈉、月桂醯基硫酸肌胺酸鈉、聚氧乙烯(20) 去水山梨醇單月桂酸酯、或其等之組合。

8.根據實施方式 2 至 7 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種核苷酸，包含自然存在之核苷酸、非自然存在之核苷酸、或其等之組合。

9.根據實施方式 8 之珠粒撞擊系統，其中該一或多種核苷酸包含一或多種自然存在之去氧核糖核苷酸、一或多種自然存在之核糖核苷酸、或其等之組合。

10.根據實施方式 9 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種去氧核糖核苷酸，包含去氧腺苷單磷酸、去氧鳥苷單磷酸、去氧胞嘧啶單磷酸、去氧胸苷單磷酸、或其等之組合。

11.根據實施方式 9 或實施方式 10 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種核糖核苷酸，包含腺苷單磷酸、鳥苷單磷酸、胞嘧啶單磷酸、胸苷單磷酸、或其等之組合。

12.根據實施方式 2 至 11 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種寡核苷酸，包含核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、核苷酸類似物、或其等之組合。

13.根據實施方式 12 之珠粒撞擊系統，其中該封阻劑包含一或多種寡核苷酸，其各自獨立係 2 至 120 個核苷酸長、2 至 100 個核苷酸長、2 至 50 個核苷酸長、2 至 25 個核苷酸長、5 至 40 個核苷酸、2 至 15 個核苷酸長、8 至 120 個核苷酸長、8 至 80 個核苷酸長、10 至 100 個核苷酸長、15 至 50 個核苷酸長、50 至 100 個核苷酸長、或 100 至 120 個核苷酸長。

14.根據實施方式 12 或實施方式 13 之珠粒撞擊系統，其中該寡核苷酸包含 DNA 及/或 RNA。

15.根據實施方式 1 至 14 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中該樣本管之內腔係以該封阻劑之層或薄膜至少部分地塗覆。

16.根據實施方式 1 至 15 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中所述珠粒中之一些或所有者係以該封阻劑之層或薄膜部分地或完全地塗覆。

17.根據實施方式 1 至 16 中之任一者之珠粒撞擊系統，其包含含有該封阻劑之粉末。

18.根據實施方式 17 之珠粒撞擊系統，其中該粉末係含有該封阻劑之經冷凍乾燥之粉末。

19.根據實施方式 1 至 18 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中所述珠粒係

適用於溶胞細菌、酵母菌、絲狀真菌、孢子、植物細胞、或動物細胞。

20.根據實施方式 1 至 19 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中所述珠粒包含礦物質珠粒、陶瓷珠粒、玻璃珠粒、金屬珠粒、或其等之組合。

21.根據實施方式 20 之珠粒撞擊系統，其中所述珠粒包含鋯珠粒、鋯英石珠粒、氧化鋯珠粒、石英珠粒、氧化鋁珠粒、碳化矽珠粒、陶瓷珠粒、二氧化矽玻璃珠粒、不銹鋼珠粒、鉻鋼珠粒、或其等之組合。

22.根據實施方式 1 至 21 中之任一者之珠粒撞擊系統，其中所述珠粒具有範圍在 50  $\mu\text{m}$  至 3 mm 之直徑。

23.根據實施方式 1 至 22 中之任一者之珠粒撞擊系統，其進一步包含置於該樣本管之內腔內之伸乙二胺四乙酸（EDTA）及/或其之鈉鹽。

24.根據實施方式 1 至 22 中之任一者之珠粒撞擊系統，其進一步包含置於該樣本管之內腔內之肌酐。

25.一種用於溶胞液體樣本中所含之細胞（例如以自所述細胞萃取核酸）之方法，其包含在足以溶胞所述細胞之條件下攪動在根據實施方式 1 至 24 中之任一者之珠粒撞擊系統之樣本管內之該液體樣本。

26.一種用於溶胞含有外源性封阻劑之液體樣本中所含之細胞（例如以自所述細胞萃取核酸）之方法，其包含在溶胞緩衝液及/或添加劑不存在下攪動在包含珠粒撞擊管與珠粒之珠粒撞擊系統內之該液體樣本。

27.一種用於溶胞尚未以溶胞緩衝液培養之液體樣本中所含之細胞（例如以自所述細胞萃取核酸）之方法，其包含攪動在包含珠粒撞擊管與珠粒之珠粒撞擊系統內之該液體樣本與一或多種封阻劑，視需要其中該一或多種封阻劑係存在於根據實施方式 1 至 24 中之任一者之珠粒撞擊管中之封阻

劑。

28.根據實施方式 26 或實施方式 27 之方法，其中所述珠粒係適用於溶胞細菌、酵母菌、絲狀真菌、孢子、植物細胞、或動物細胞。

29.根據實施方式 26 至 28 中之任一者之方法，其中所述珠粒包含礦物質珠粒、陶瓷珠粒、玻璃珠粒、金屬珠粒、或其等之組合。

30.根據實施方式 29 之方法，其中所述珠粒包含鋯珠粒、鋯英石珠粒、氧化鋯珠粒、石英珠粒、氧化鋁珠粒、碳化矽珠粒、陶瓷珠粒、二氧化矽玻璃珠粒、不銹鋼珠粒、鉻鋼珠粒、或其等之組合。

31.根據實施方式 26 至 30 中之任一者之方法，其中所述珠粒具有範圍在 50  $\mu\text{m}$  至 3 mm 之直徑。

32.根據實施方式 25 至 26 中之任一者之方法，其進一步包含於攪動該液體樣本前將該液體樣本放置在該樣本管內之步驟。

33.根據實施方式 25 或實施方式 32 之方法，其中該攪動包含使該珠粒撞擊系統經受振盪運動。

34.根據實施方式 25 至 33 中之任一者之方法，其中該樣本係生物樣本、環境樣本、或食物產品。

35.根據實施方式 34 之方法，其中該樣本係選自以下者之生物樣本：血液、血清、唾液、尿液、胃液、消化液、眼淚、糞便、精液、陰道分泌物、組織間隙液、源自腫瘤性組織之液體、眼液、汗液、黏液、耳垢、油、腺體分泌物、呼吸、脊髓液、毛髮、指甲、皮膚細胞、血漿、自鼻拭子獲得之液體、自鼻咽洗液獲得之液體、腦脊液、組織樣本、自喉拭子獲得之液體或組織、自創傷拭子獲得之液體或組織、生檢組織、胎盤液、羊水、腹

膜透析液、臍帶血、淋巴液、腔液、痰、膿、微生物相、胎糞、母乳、或將以上者之任一者處理、萃取或分離之樣本。

36.根據實施方式 35 之方法，其中該生物樣本係尿液、痰或將尿液處理、萃取或分離之樣本。

37.根據實施方式 35 之方法，其中該生物樣本係痰或將痰處理、萃取或分離之樣本。

38.根據實施方式 35 之方法，其中該生物樣本係創傷拭子或將創傷拭子處理、萃取或分離之樣本。

39.根據實施方式 35 之方法，其中該生物樣本係血液或將血液處理、萃取或分離之樣本。

40.根據實施方式 35 之方法，其中該生物樣本係腹膜透析液或將腹膜透析液處理、萃取或分離之樣本。

41.根據實施方式 34 之方法，其中該樣本係選自以下者之環境樣本：土壤、地下水、地表水、廢水、或將以上者之任一者處理、萃取或分離之樣本。

42.根據實施方式 25 至 41 中之任一者之方法，其中所述細胞包含一或多種病原體。

43.根據實施方式 42 之方法，其中該一或多種病原體包含一或多種細菌病原體、病毒病原體、真菌病原體、或其等之組合。

44.根據實施方式 42 或實施方式 43 之方法，其中該一或多種病原體包含以下者之一或多者：結核分枝桿菌、鳥分枝桿菌副結核亞種、金黃色葡萄球菌、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌（MRSA）、釀膿鏈球菌、肺

炎鏈球菌、無乳鏈球菌、流行性感嗜血桿菌、副流感嗜血桿菌、卡他摩氏菌、肺炎克留氏菌、大腸桿菌、銅綠假單胞菌、不動桿菌屬物種、百日咳博德氏桿菌、腦膜炎雙球菌、炭疽桿菌、奴卡氏菌屬物種、放線菌屬物種、肺炎黴漿菌、肺炎披衣菌、退伍軍人桿菌屬物種、傑氏肺囊蟲、A 型流行性感病毒、細胞巨大病毒、鼻病毒、屎腸球菌、鮑氏不動桿菌、無黴菌酸棒狀桿菌、產氣腸桿菌、糞腸球菌 CI 4413、萎垂沙雷氏菌、馬鏈球菌、與白色念珠菌。

45.根據實施方式 42 之方法，其中該樣本係痰或將痰處理、萃取或分離之樣本且該一或多種病原體包含以下者之一或多者：結核分枝桿菌、金黃色葡萄球菌、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌 (MRSA)、釀膿鏈球菌、肺炎鏈球菌、無乳鏈球菌、流行性感嗜血桿菌、副流感嗜血桿菌、卡他摩氏菌、肺炎克留氏菌、大腸桿菌、銅綠假單胞菌、不動桿菌屬物種、百日咳博德氏桿菌、腦膜炎雙球菌、炭疽桿菌、奴卡氏菌屬物種、放線菌屬物種、肺炎黴漿菌、肺炎披衣菌、退伍軍人桿菌屬物種、傑氏肺囊蟲、A 型流行性感病毒、細胞巨大病毒、與鼻病毒。

46.根據實施方式 45 之方法，其中該一或多種病原體包含結核分枝桿菌。

47.根據實施方式 42 之方法，其中該樣本係乳汁或精液、或將乳汁、土壤、排泄物、或精液處理、萃取或分離之樣本，且該一或多種病原體包含鳥分枝桿菌副結核亞種。

48.根據實施方式 42 之方法，其中該樣本係創傷拭子或將創傷拭子處理、萃取或分離之樣本且該一或多種病原體包含以下者之一或多者：大腸桿菌、銅綠假單胞菌、屎腸球菌、金黃色葡萄球菌、肺炎克留氏菌、鮑氏

不動桿菌、無黴菌酸棒狀桿菌、產氣腸桿菌、糞腸球菌 CI 4413、萎垂沙雷氏菌、馬鏈球菌與白色念珠菌。

49.根據實施方式 42 之方法，其中該樣本係腹膜透析液或將腹膜透析液處理、萃取或分離之樣本且該一或多種病原體包含金黃色葡萄球菌及/或銅綠假單胞菌。

50.根據實施方式 25 至 49 中之任一者之方法，其中該液體樣本包含來自多種物種之細胞。

51.根據實施方式 25 至 50 中之任一者之方法，其進一步包含在細胞溶胞後從該樣本管回收該液體樣本。

52.根據實施方式 51 之方法，其進一步包含自所回收之液體樣本純化所述核酸。

53.根據實施方式 25 至 52 中之任一者之方法，其進一步包含分析所述核酸之一或多者。

54.根據實施方式 53 之方法，其中該分析係使用微陣列或藉由定序該一或多種核酸來執行。

55.根據實施方式 53 或實施方式 54 之方法，其中於執行該分析前目標序列被擴增。

56.根據實施方式 55 之方法，其中該目標序列係藉由 PCR 擴增。

57.根據實施方式 25 至 56 中之任一者之方法，其中該核酸包含 DNA。

58.根據實施方式 25 至 57 中之任一者之方法，其中該核酸包含 RNA。

59.一種用於溶胞液體樣本中所含之細胞（例如以自所述細胞萃取核酸）之套組，其包含根據實施方式 1 至 24 中之任一者之珠粒撞擊系統與視需要

之：(i)一或多種用於製備該液體樣本之組份、(ii)一或多種用於擴增所述核酸之一或多者之寡核苷酸、(iii)一或多種用於偵測所述核酸之一或多者之探針、或(iv) (i)至(ii)之任何組合。

60.根據實施方式 59 之套組，其包含一或多種用於製備該液體樣本之組份，且其中該一或多種用於製備該液體樣本之組份包含水、鹽水、緩衝液、過濾器、或其等之組合。

61.根據實施方式 59 或實施方式 60 之套組，其包含一或多種用於擴增所述核酸之一或多者之寡核苷酸。

62.根據實施方式 59 至 61 中之任一者之套組，其包含一或多種用於偵測所述核酸之一或多者之探針。

63.一種用於獲得根據實施方式 1 至 24 中之任一者之珠粒撞擊系統之套組，其包含樣本管、珠粒、與乾封阻試劑。

64.根據實施方式 63 之套組，其中所述珠粒及/或乾封阻試劑係與該樣本管分開地包含在該套組中。

65.根據實施方式 63 之套組，其中所述珠粒及/或乾封阻試劑係在該樣本管內包含在該套組中。

66.根據實施方式 63 至 65 中之任一者之套組，其進一步包含一或多種用於製備含有供使用該珠粒撞擊系統來萃取核酸之用之細胞之樣本之組份、一或多種用於擴增一或多種核酸之寡核苷酸、一或多種用於偵測一或多種核酸之探針、或其等之組合。

67.一種珠粒撞擊管(1)，其包含樣本管，該樣本管包含容器構件(2)，該容器構件(2)具有內腔(3)、孔洞(4)，該孔洞(4)係用於將潛在含有微生物之樣

本液(5)充至該內腔(3)中、與封閉物(6)，該封閉物(6)係用於關閉該孔洞(4)，其中複數個肉眼可見之礦物質顆粒(7)被佈置於該內腔(3)中，其係適用於在該樣本液(5)被充至該內腔(3)中且該珠粒撞擊管(1)經受機械振盪時機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁(5)，其特徵在於包含尿素及/或至少一種胍鹽及/或至少一種清潔劑之封阻劑(8)被以乾燥形式佈置於該樣本管之內腔(3)中。

68.根據實施方式 67 之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該封阻劑(8)包含去氧腺苷單磷酸、去氧鳥苷單磷酸、去氧胞嘧啶單磷酸、去氧胸苷單磷酸、或此等單磷酸之至少二者之混合物。

69.根據實施方式 67 或 68 之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該封阻劑(8)包含腺苷單磷酸、鳥苷單磷酸、胞嘧啶單磷酸、胸苷單磷酸、或此等單磷酸之至少二者之混合物。

70.根據實施方式 67 至 69 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於至少一種該封阻劑(8)中所含之單磷酸係至少 2 個且至多 120 個核苷酸之寡核苷酸。

71.根據實施方式 67 至 70 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該至少一種清潔劑包含十二烷基硫酸鈉、月桂醯基硫酸肌胺酸鈉及/或聚氧乙烯(20)去水山梨醇單月桂酸酯。

72.根據實施方式 67 至 71 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該乾燥封阻劑被鬆散地佈置於該容器構件(2)之內腔(3)中，較佳係呈粉末形式。

73.根據實施方式 67 至 72 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該容器構件(2)之內壁係至少部分地以封阻劑之層或封阻劑之薄膜塗覆。

74.根據實施方式 67 至 73 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於伸乙二胺四乙（EDTA）酸及/或其之鈉鹽被佈置於該樣本管之內腔(3)中。

75.根據實施方式 67 至 74 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於肌酐被佈置於該樣本管之內腔(3)中。

76.一種根據實施方式 67 至 75 中任一者之珠粒撞擊管(1)之用途，其係用於自微生物萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸。

77.一種用於自微生物萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸之方法，其中提供被假定為含有所述微生物之樣本液(5)，其中複數個相對於彼此係可移動的礦物質顆粒(7)被導入至該樣本液(5)中且該其中含有所述顆粒(7)之樣本液(5)被振盪以使得所述顆粒(7)能夠機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁(5)，其特徵在於包含尿素及/或至少一種胍鹽及/或至少一種清潔劑之封阻劑(8)於所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時被導入該樣本液(5)中。

78.根據實施方式 77 之方法，其特徵在於尿素之量係與該樣本液(5)之量匹配以使得溶解於該樣本液中之尿素之濃度(5)範圍在 10 與 100 克每公升之間，特別係在 20 與 50 克每公升之間，且較佳係在 25 與 35 克每公升之間。

79.根據實施方式 77 或 78 之方法，其特徵在於在所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時，以下單磷酸之至少一者被導入至該樣本液(5)中：去氧腺苷單磷酸、去氧鳥苷單磷酸、去氧胞嘧啶單磷酸、去氧胸苷單磷酸。

80.根據實施方式 77 至 79 中之任一者之方法，其特徵在於在所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時，以下單磷酸之至少一者被導入至該

樣本液(5)中：腺苷單磷酸、鳥苷單磷酸、胞嘧啶單磷酸、胸苷單磷酸。

81.根據實施方式 77 至 80 中之任一者之方法，其特徵在於肌酐及/或伸乙二胺四乙酸（EDTA）及/或其之鈉鹽於所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時被導入該樣本液(5)中。

## 9.文獻之引用

【0147】 於本申請案中引用之所有公開案、專利案、專利申請案與其他文件特此為所有目的以其等之全體以用方式納入，其程度與每個個別公開案、專利案、專利申請案或其他文件被個別指出係為所有目的以用方式納入相同。於一或多個併入本文中之文獻之教示與本文之揭示內容之間有不一致之情況下，應使用本說明書之教示。

### 9.1 EP16153540 之併入

【0148】 本發明係關於珠粒撞擊管，其包含樣本管，該樣本管包含容器構件，該容器構件具有內腔、用於將含有微生物之樣本液充至該內腔中之孔洞、與用於關閉該孔洞之封閉物，其中複數個肉眼可見之礦物質顆粒被佈置於該內腔中，其等係適用於在該樣本液被充至該內腔中且該撞擊撞擊管經受機械振盪時機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁。本發明進一步係關於用於自微生物萃取去氧核糖核酸（DNA）及/或核糖核酸（RNA）之方法，其中樣本液（其被假定為含有所述微生物）被提供，其中相對於彼此係可移動的複數個礦物質顆粒被導入該樣本液中且於其中含有所述顆粒之該樣本液被振盪以使得所述顆粒能夠機械性地破壞該樣本液

中所含之微生物之細胞壁。

【0149】 感染性疾病之遺傳檢定與診斷於臨床微生物學之領域中扮演重要角色。為克服基於培養之方法學固有之偏差與限制，遺傳檢定越來越常被用於偵測樣本中所含之微生物。為了使如此遺傳檢定可被執行，DNA 及/或 RNA 首先必須以越高越好之濃度自微生物萃取。於由 Zhongtang Yu 等人於 “Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples” , BioTechniques, Vol. 36, No. 5, p. 808 - 812 (2004 年 5 月)中提出之方法中，0.25 g 之取自母牛之胃腸系統之樣本液被提供，其被假定為含有微生物，即細菌。該樣本液首先與 1 mL 之含有 500 mM 氯化鈉、50 mM Tris 鹽酸鹽，pH 8.0、50 mM 伸乙二胺四乙酸、與 4% 十二烷基硫酸鈉之緩衝液混合。此外，0.4 g 無菌銼英石珠粒被導入該樣本液中。所獲得之混合物隨後於樣本管中以 Mini-BeadBeater™ 振盪三分鐘，使得珠粒破壞微生物之細胞壁。於此程序中，細胞所含之 DNA 被釋放。該緩衝液亦有用於保護 DNA 免於被樣本液中所含之 DNA 酶降解。

【0150】 於執行該珠粒撞擊後，雜質係藉由以醋酸銨沈澱來自樣本移除。核酸係藉由以異丙醇沈澱來獲得。於進一步方法步驟中，DNA 係依序以 RNA 酶與蛋白酶 K 消化並隨後以管柱純化。

【0151】 該方法有以下不利：其係相對複雜的。因為樣本液由於該緩衝液之添加而被稀釋，樣本中之 DNA 濃度減低。因此，該方法僅允許有限之偵測正確性與敏感性。

【0152】 因此目標為提供開頭提及之類型之珠粒撞擊管與方法，其使去氧核糖核酸及/或核糖核酸可自樣本液中所含之微生物快速地並以足以用

於偵測之量萃取。

【0153】 有關撞擊撞擊管，此目標係利用以下描述之實施方式 1' 之特徵解決。其等規定包含尿素及/或至少一種胍鹽及/或至少一種清潔劑之封阻試劑被以乾燥形式佈置於該樣本管之內腔中。

【0154】 令人意外地，結果係當使用如此撞擊撞擊管以自樣本液中所含之微生物萃取去氧核糖核酸（DNA）及/或核糖核酸（RNA）時，相較於當使用不含有該封阻試劑之相對應珠粒撞擊管時，可達成較大之 DNA 及/或 RNA 萃取率。假定該封阻試劑封阻該樣本管之內腔中所含之礦物質顆粒之結合位置且因此預防自所述微生物萃取之 DNA 及/或 RNA 與此等結合位置結合。於自該樣本液移除所述顆粒後（其可例如被執行以使得沈澱於該樣本管之底部之所述顆粒與位於所述顆粒上面之該樣本液被以移液管或類似者自該樣本管移出），該樣本管中所含之 DNA 及/或 RNA 之相對大部分會接著造成該樣本液。該至少一種清潔劑封阻位於該樣本管之內壁之結合位置至與預防核糖核（RNA）酸及/或去氧核糖核酸（DNA）與此等結合位置結合。此亦會使 DNA 及/或 RNA 之高萃取率成為可能。

【0155】 由於該封阻試劑之存在，甚至可能可不需於珠粒撞擊前以萃取緩衝液稀釋該樣本液。於此實例中，該樣本液僅被可於該樣本液中以比典型於萃取緩衝液中者低相當多之濃度存在之封阻試劑稀釋。

【0156】 礦物質顆粒係結晶顆粒、陶瓷顆粒、及/或玻璃。當其等被佈置於該樣本液中時，所述顆粒相對於彼此係可移動的。所述顆粒較佳包含石英顆粒及/或鋯英石顆粒。如此顆粒可便宜地以大量獲得且對於去氧核糖核酸或核糖核酸而言係化學惰性的。石英及/或顆粒具有相對高之比重，

係堅硬的且可具有銳邊。因此，其等在暴露至機械震動時極適合用於打開細胞膜。

【0157】 該乾封阻試劑較佳係長期穩定的，即該珠粒撞擊管可被無問題地運輸與儲存一段較長之時期而該封阻試劑之封阻性功效不會減少相當大。該乾封阻試劑可被鬆散地佈置於該容器構件之內腔內，及/或該容器構件之內壁可以該封阻試劑之層或該封阻試劑之薄膜塗覆。該封阻試劑較佳係經冷凍乾燥。

【0158】 使用根據本發明之珠粒撞擊管，以下者是可能的：使用本身已知的方法以足以直接微生物地檢查 DNA 及/或 RNA 之濃度自該樣本液中所含之微生物萃取該 DNA 及/或 RNA。此可特別藉由以下者發生：將該樣本液與固定在表面上之受體接觸，所述受體專一性地與該 DNA 及/或 RNA 結合及/或與其中所含之 DNA 及/或 RNA 組份結合。該 DNA 及/或 RNA 及/或 DNA 及/或 RNA 組份與所述受體之結合可使用本身已知的方式以標誌（特別是光學標誌，諸如螢光染料）偵測且若需要定量。

【0159】 該至少一種胍鹽較佳包含異氰酸胍及/或氯化胍。

【0160】 於本發明之較佳實施方式中，該封阻試劑包含去氧腺苷單磷酸、去氧鳥苷單磷酸、去氧胞嘧啶單磷酸、去氧胸苷單磷酸、或此等單磷酸之至少二者之混合物。此等單磷酸可封阻去氧核糖核酸（DNA）可與之結合之所述顆粒之結合位置。

【0161】 於本發明之較佳實施方式中，該封阻試劑包含腺苷單磷酸、鳥苷單磷酸、胞嘧啶單磷酸、胸苷單磷酸、或此等單磷酸之至少二者之混合物。此等單磷酸可封阻核糖核酸（RNA）可與之結合之所述顆粒之結合

位置。核糖核酸比去氧核糖核酸容易降解且因此較適用於樣本製備。

【0162】 若該封阻試劑中所含之至少一單磷酸係至少 2 個且至多 120 個之寡核苷酸（例如 RNA 及/或 DNA 核苷酸），則其係有益的。該至少一單磷酸隨即係易於合成地產生。

【0163】 於本發明之便利之實施方式中，該至少一種清潔劑包含十二烷基硫酸(dodecylsulafte)鈉、月桂鹽基硫酸肌胺酸鈉及/或聚氧乙烯-(20)-去水山梨醇單月桂酸酯。聚氧乙烯-(20)-去水山梨醇單月桂酸酯亦以聚山梨糖醇酯 20 為人所知。此封阻位於該樣本管之內壁之結合位置至與預防核糖核酸及/或去氧核糖核酸與此等結合位置結合。

【0164】 於本發明之有利實施方式中，該乾燥封阻試劑係鬆散地佈置於該容器構件之內腔中，較佳係呈粉末形式。該粉末可與所述顆粒混合。

【0165】 於本發明之較佳實施方式中，該容器構件之內壁至少部分地以該封阻試劑之層或該封阻試劑之薄膜塗覆。該封阻試劑接著捕捉性地與該容器構件連接。

【0166】 若肌酐被佈置於該樣本管之內腔中，則其係有利的。於該樣本管之內腔中肌酐之存在對該樣本液中所含之去氧核糖核酸及/或核糖核酸之降解起反作用。此外，肌酐預防該 DNA 及/或 RNA 非專一性地與所述珠粒及/或該樣本管之內壁結合。此在使用該珠粒撞擊管自該樣本液中所含之微生物萃取 DNA 及/或 RNA 時使較大之產率成為可能。

【0167】 於本發明之便利之實施方式中，伸乙二胺四乙酸及/或其之鈉鹽被佈置於該樣本管之內腔中。伸乙二胺四乙酸與鈣、鎂及鐵結合且因此使去氧核糖核酸酶與核糖核酸酶失活。此方法亦對該樣本液中所含之去

氧核糖核酸與核糖核酸之降解起反作用。因此，測量結果之較高之偵測敏感性與再現性在檢查使用根據本發明之珠粒撞擊管自微生物萃取之去氧核糖核酸及/或核糖核酸之期間成為可能。

【0168】 有關該方法，以上提及之目標係以實施方式 11' 之特徵解決。其等規定包含尿素、至少一種胍鹽及/或至少一種清潔劑之封阻試劑於所述顆粒被振盪前及/或被振盪時被導入該樣本液中。

【0169】 於本發明之較佳實施方式中，尿素之量係與該樣本液之量匹配以使得溶解於該樣本液中之尿素之濃度範圍在

-介於 10 與 100 克每公升之間，特別係

-介於 20 與 50 克每公升之間，且較佳係

-介於 25 與 35 克每公升之間。

【0170】 此在萃取該去氧核糖核酸及/或該核糖核酸時使高產率成為可能。

【0171】 於本發明之較佳實施方式中，清潔劑之量係與該樣本液之量匹配以使得溶解於該樣本液中之清潔劑之濃度係介於 1 與 50 mg / mL 之間。

【0172】 於以下，本發明之實施方式會藉由圖式詳細解釋。

【0173】 於圖 1 至 3 中以 1 稱呼之珠粒撞擊管包含樣本管，其包含容器構件 2，該容器構件 2 具有內腔 3 與可封閉之孔洞 4。該樣本管較佳係由塑膠構成，但亦可由另一生物惰性材料構成。

【0174】 被假定為含有微生物之樣本液 5 可透過該孔洞 4 充至該容器構件 2 之內腔 3 中與自其移除。對於關閉該孔洞 4，該樣本管具有封閉物 6，其適用於搬至開放位置與封閉位置且被設計成封閉蓋，其包含內螺紋，其

適用於旋擰上由該樣本管 2 之外壁之邊緣區域提供之外螺紋，其與該孔洞 4 結合。

【0175】 於該內腔 3 中，2 克之二氧化矽被進一步佈置，其包含複數個顆粒 7，其等之最大尺寸平均係大約 100  $\mu\text{m}$ 。所述珠粒 7 可以鬆散之團塊之形式獲得，於其中其等相對於彼此係可移動的。代替該等二氧化矽之顆粒 7 或除了其等外，該內腔 3 中亦可含有適當尺寸之鋯顆粒。

【0176】 當該樣本液 5 被充至該內腔中且該珠粒撞擊管經受機械振盪（例如超音波振盪）時，所述顆粒 7 有用於機械性地破壞該樣本液 5 中所含之微生物之細胞壁。其等可以未於圖式中以細節闡明之振盪產生器產生且可轉傳至該珠粒撞擊管 1。如此振盪產生器係商業上可自 MP Biomedicals 以 MPBio 珠粒撞擊器之名購得。由於細胞壁之破壞，所述微生物中所含之去氧核糖核酸被釋放並溶解於該樣本液 5 中。

【0177】 於該管 1 之內腔 3 中，經冷凍乾燥封阻試劑 8 亦被佈置，其係如下製備：

【0178】 提供 5 毫克乙二胺四酸之四鈉鹽（ $\text{Na}_4\text{-EDTA}$ ）、25 毫克腺苷單磷酸、25 毫克鳥苷單磷酸、25 毫克胞嘧啶單磷酸、25 毫克胸苷單磷酸與 15 mg 月桂醯肌胺酸鈉。為使此等統治者穩定，將其等以 5x 之濃度溶解於 TE 緩衝液中。為了溶解度之原因，使用乙二胺四酸之四鈉鹽，因為其良好地溶於水中。1 毫升隨即由 250 毫克尿素、25 毫克乙二胺四酸之四鈉鹽、125 毫克腺苷單磷酸、125 毫克鳥苷單磷酸、125 毫克胞嘧啶單磷酸、125 毫克胸苷單磷酸及 75 mg 月桂醯肌胺酸鈉組成。

【0179】 將 200 微升之此溶液置於該容器構件 2 中並藉由真空乾燥。

該經乾燥中封阻試劑 8 穩定至少一年。如可於圖 4 中看到的，該封阻試劑 8 被施用在該容器構件 2 之內壁上，呈於內腔 3 之較低部分區域中之薄層，其與該孔洞 4 在空間上分開。

實施方式：

【0180】 通過 0,4 微米無菌過濾器過濾 6 毫升尿液與腹膜透析液並接著添加 10.000 菌落形成單位每毫升於培養實驗室中生長之金黃色葡萄球菌。

本發明之方法。

【0181】 將 2.9 毫升之經摻加尿液與經摻加腹膜透析液轉移至以上描述之管 1 中。以螺旋蓋 6 密封該管並將其夾在 MPBio 珠粒撞擊器中並以全功率運行 30 秒。移除封閉物 6 並放置在商業 DNA 分離裝置之樣本架上。取出 2 毫升之各樣本並接著添加 DNA 萃取劑 (labturbo) 並執行 DNA 萃取。產生 100 微升之 DNA 萃取物。

標準方法：

【0182】 將 2,9 毫升之經摻加尿液與經摻加腹膜透析液轉移至管子中以用於使用 2,0 克之 100 微米矽石 ( $\text{SiO}_2$ ) 珠粒來珠粒撞擊。該管不含有該封阻試劑 8 且無添加其他試劑。藉由封閉物密封該管並將其夾在 MPBio 珠粒撞擊器中並以全功率運行 30 秒。移除該封閉物並放置在商業 DNA 分離裝置之樣本架上。取出 2 毫升之各樣本並接著添加 DNA 萃取劑 (labturbo) 並執行 DNA 萃取。產生 100 微升之 DNA 萃取物。

所萃取之 DNA 之偵測

【0183】 所萃取之金黃色葡萄球菌 DNA 之量係藉由即時聚合酶連鎖反應根據以下者測定：Gillespie, G.E.等人，"Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction", J. Dairy Sci. 88:3510 - 3518 (2005)。於 20 微升反應中擴增 1 微升之所萃取 DNA。該標準方法對於尿液產生 32 之循環閾值且對於腹膜透析液產生 38 之循環閾值，顯示差的 DNA 回收。

【0184】 本發明之方法對於尿液產生 31 之循環閾值且對於腹膜透析液產生 32 之循環閾值，顯示在此等條件下對於腹膜透析液有遠較佳之回收。

【0185】 本文之揭示內容係藉由以下特殊實施方式例示。

1' .一種珠粒撞擊管(1)，其包含樣本管，該樣本管包含容器構件(2)，該容器構件(2)具有內腔(3)、孔洞(4)，該孔洞(4)係用於將潛在含有微生物之樣本液(5)充至該內腔(3)中、與封閉物(6)，該封閉物(6)係用於關閉該孔洞(4)，其中複數個肉眼可見之礦物質顆粒(7)被佈置於該內腔(3)中，其係適用於在該樣本液(5)被充至該內腔(3)中與該珠粒撞擊管(1)經受機械振盪時機械性地破壞該樣本液(5)中所含之微生物之細胞壁，其特徵在於包含以下者之封阻試劑(8)被以乾燥形式佈置於該樣本管之內腔(3)中

-尿素及/或

-至少一種胍鹽及/或

-至少一種清潔劑。

2' .根據實施方式 1' 之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該封阻試劑(8)包含

- 去氧腺苷單磷酸、
- 去氧鳥苷單磷酸、
- 去氧胞嘧啶單磷酸、
- 去氧胸苷單磷酸、

或此等單磷酸之至少二者之混合物。

3' .根據實施方式 1' 或 2' 之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該封阻試劑(8)包含

- 腺苷單磷酸、
- 鳥苷單磷酸、
- 胞嘧啶單磷酸、
- 胸苷單磷酸、

或此等單磷酸之至少二者之混合物。

4' .根據實施方式 1' 至 3' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該封阻試劑(8)中所含之至少一種單磷酸係至少 2 個且至多 120 個核苷酸之寡核苷酸。

5' .根據實施方式 1' 至 4' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該至少一種清潔劑包含十二烷基硫酸鈉、月桂醯基硫酸肌胺酸鈉及/或聚氧乙烯-(20)-去水山梨醇單月桂酸酯。

6' .根據實施方式 1' 至 5' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該乾燥封阻試劑被鬆散地佈置於該容器構件(2)之內腔(3)中，較佳係呈粉末形式。

7' .根據實施方式 1' 至 6' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於該容器構件(2)之內壁係至少部分地以該封阻試劑之層或該封阻試劑之薄膜塗覆。

8' .根據實施方式 1' 至 7' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於伸乙二胺四乙酸及/或其之鈉鹽被佈置於該樣本管之內腔(3)中。

9' .根據實施方式 1' 至 8' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)，其特徵在於肌酐被佈置於該樣本管之內腔(3)中。

10' .一種根據實施方式 1' 至 9' 中之任一者之珠粒撞擊管(1)之用途，其係用於自微生物萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸。

11' .一種用於自微生物萃取去氧核糖核酸及/或核糖核酸之方法，其中提供被假定為含有所述微生物之樣本液(5)，其中複數個相對於彼此係可移動的礦物質顆粒(7)被導入至該樣本液(5)中且該其中含有所述顆粒(7)之樣本液(5)被振盪以使得所述顆粒(7)能夠機械性地破壞該樣本液中所含之微生物之細胞壁(5)，其特徵在於包含以下者之封阻試劑(8)於所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時被導入該樣本液(5)中

-尿素及/或

-至少一種胍鹽及/或

-至少一種清潔劑。

12' .根據實施方式 11' 之方法，其特徵在於尿素之量係與該樣本液(5)之量匹配以使得溶解於該樣本液(5)中之尿素之濃度範圍

-在 10 與 100 克每公升之間，特別係

-在 20 與 50 克每公升之間，且較佳係

-在 25 與 35 克每公升之間。

13' .根據實施方式 11' 或 12' 之方法，其特徵在於在所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時，以下單磷酸之至少一者被導入至該樣本液(5)中：

- 去氧腺苷單磷酸、
- 去氧鳥苷單磷酸、
- 去氧胞嘧啶單磷酸、
- 去氧胸苷單磷酸。

14' .根據實施方式 11' 至 13' 中之任一者之方法，其特徵在於在所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時，以下單磷酸之至少一者被導入至該樣本液(5)中：

- 腺苷單磷酸、
- 鳥苷單磷酸、
- 胞嘧啶單磷酸、
- 胸苷單磷酸。

15' .根據實施方式 11' 至 14' 中之任一者之方法，其特徵在於肌酐及/或伸乙二胺四乙酸及/或其之鈉鹽於所述顆粒(7)被振盪前及/或於所述顆粒(7)被振盪時被導入該樣本液(5)中。

## 【符號說明】

【0186】

### 1. 珠粒撞擊系統

2. 樣本管
3. 內腔
4. 孔洞
5. 樣本液
6. 封閉蓋
7. 珠粒
8. 冷凍乾燥封阻劑

## 申請專利範圍

- 1.一種用於自液體樣本中所含之細胞產生溶胞產物之方法，所述液體樣本包含血液或將血液處理、萃取或分離之樣本，所述方法包含在不存在緩衝液、不存在清潔劑且在包含尿素及/或 RNA 的一或多種內源性封阻劑存在下在足以溶胞所述細胞之條件下攪動珠粒撞擊系統內之該液體樣本，該珠粒撞擊系統包含珠粒撞擊管與珠粒。
- 2.根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該液體樣本是血液。
- 3.根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中所述液體樣本是將血液處理、萃取或分離之樣本。
- 4.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其中該攪動係在添加劑不存在下實現。
- 5.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其中所述珠粒：
  - a)係適用於溶胞細菌、酵母菌、絲狀真菌、孢子、植物細胞、或動物細胞；
  - b)包含：
    - i.礦物質珠粒、陶瓷珠粒、玻璃珠粒、金屬珠粒、或其等之組合；
    - ii.鋯珠粒、鋯英石珠粒、氧化鋯珠粒、石英珠粒、氧化鋁珠粒、碳化矽珠粒、陶瓷珠粒、二氧化矽玻璃珠粒、不銹鋼珠粒、鉻鋼珠粒、或其等之組合；
  - c)具有範圍在 50  $\mu\text{m}$  至 3 mm 之直徑；或
  - d) a)-c)之任何組合。
- 6.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其進一步包含於攪動該液體樣本前將該液體樣本放置在珠粒撞擊管內之步驟。
- 7.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其中該攪動包含使該珠

粒撞擊系統經受振盪運動。

8.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其中所述細胞包含一或多種病原體。

9.根據申請專利範圍第 8 項之方法，其中該一或多種病原體包含：

- a)一或多種細菌病原體、病毒病原體、真菌病原體、或其等之組合；或
- b)結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、鳥分枝桿菌副結核亞種 (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌 (MRSA)、釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、流行性感感冒嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血桿菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、卡他摩氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)、肺炎克雷氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、銅綠假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、不動桿菌屬 (*Acinetobacter*) 物種、百日咳博德氏桿菌 (*Bordetella pertussis*)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*)、炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*)、奴卡氏菌屬 (*Nocardia*) 物種、放線菌屬 (*Actinomyces*) 物種、肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎披衣菌 (*Chlamydia pneumoniae*)、退伍軍人桿菌屬 (*Legionella*) 物種、傑氏肺囊蟲 (*Pneumocystis jiroveci*)、A 型流行性感感冒病毒、細胞巨大病毒、鼻病毒、屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*)、無黴菌酸棒狀桿菌 (*Corynebacterium amycolatum*)、產氣腸桿菌 (*Enterobacter aerogenes*)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) CI 4413、萎垂沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、馬鏈球菌 (*Streptococcus*

*equi*)、與白色念珠菌 (*Candida albicans*) 之一或多者。

10.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其中該液體樣本包含來自多種物種之細胞。

11.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其進一步包含在細胞溶胞後自該珠粒撞擊管回收該溶胞產物。

12.根據申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包含自該溶胞產物純化核酸。

13.根據申請專利範圍第 1-3 項中任一項之方法，其進一步包含分析一或多個來自該溶胞產物的核酸。

14.根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該分析係使用微陣列或藉由定序該一或多個核酸來執行。

15.根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中於執行該分析前擴增目標序列。

16.根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中於執行該分析前藉由 PCR 擴增目標序列。

17.根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中所述核酸包含 DNA 及/或 RNA。

圖式

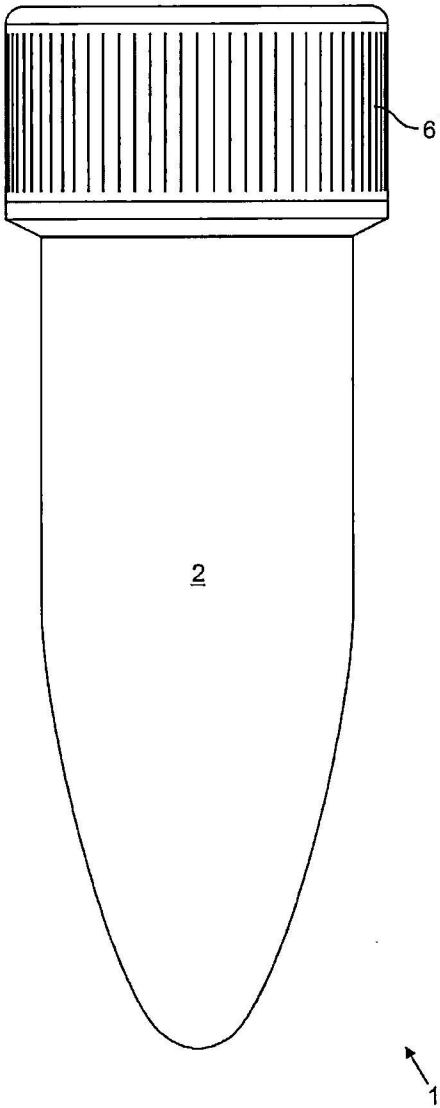


圖 1

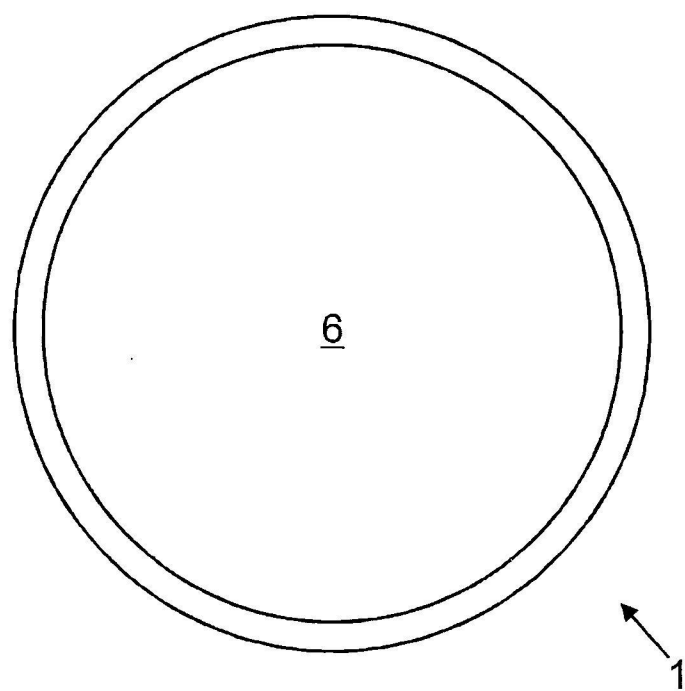


圖 2

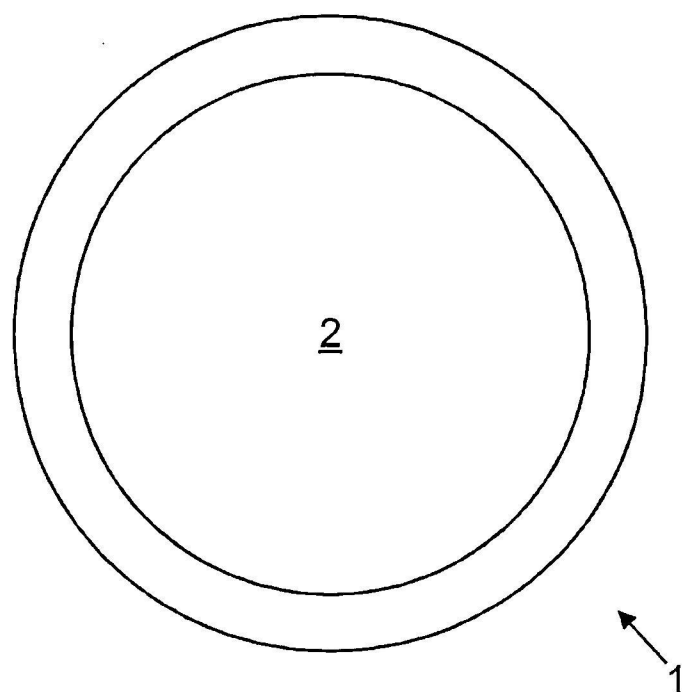


圖 3

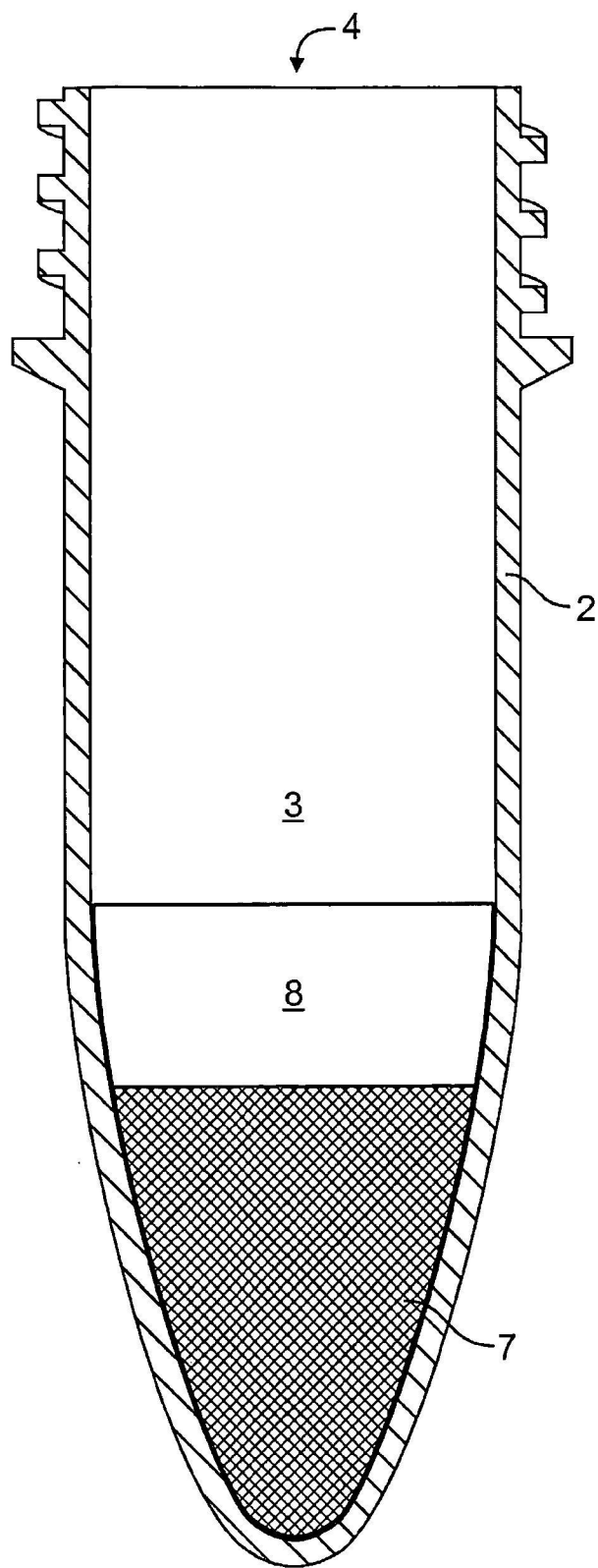


圖 4

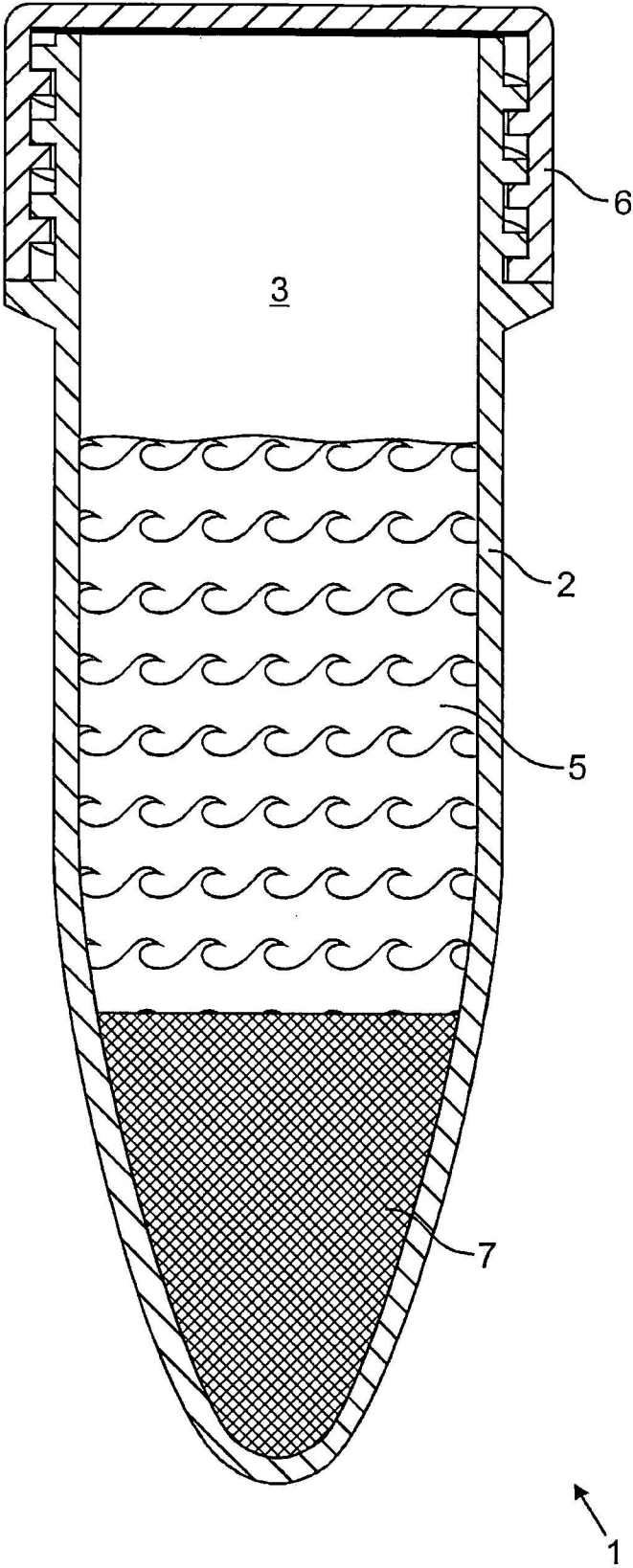


圖 5

不同濃度之尿素之功效

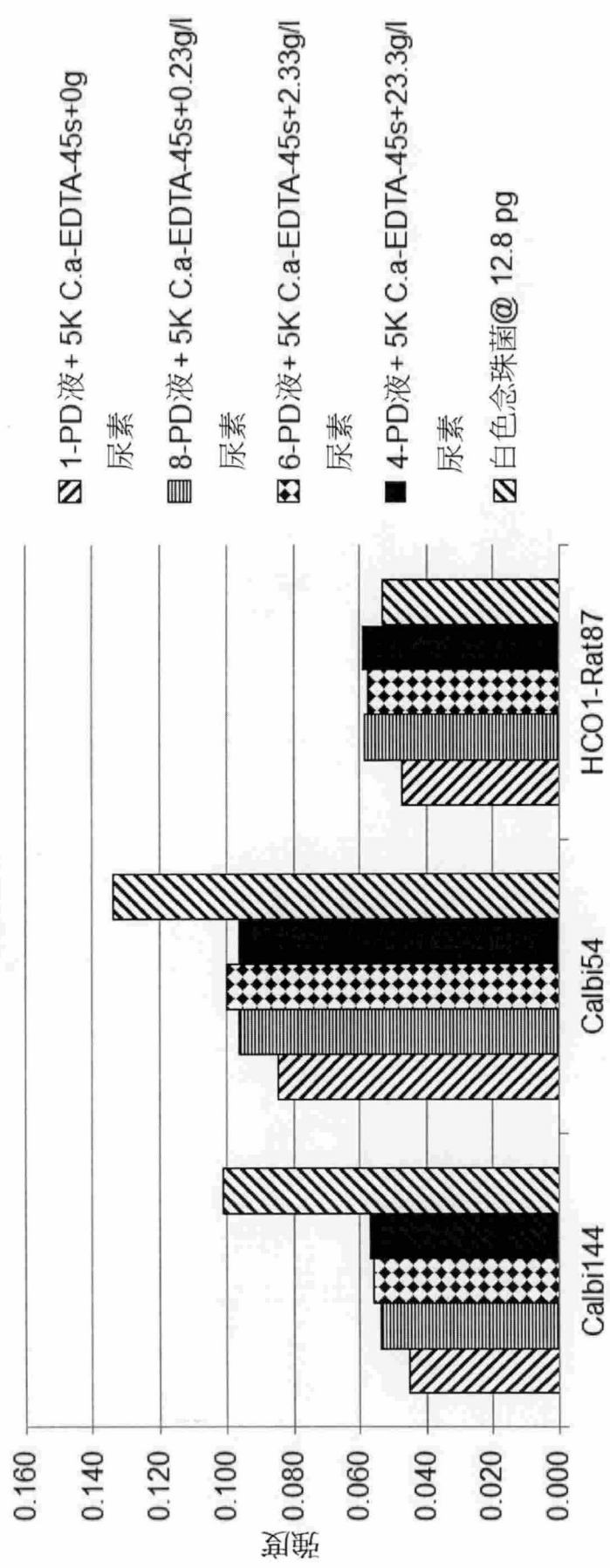


圖 6

不同濃度之尿素加BE緩衝液之功效

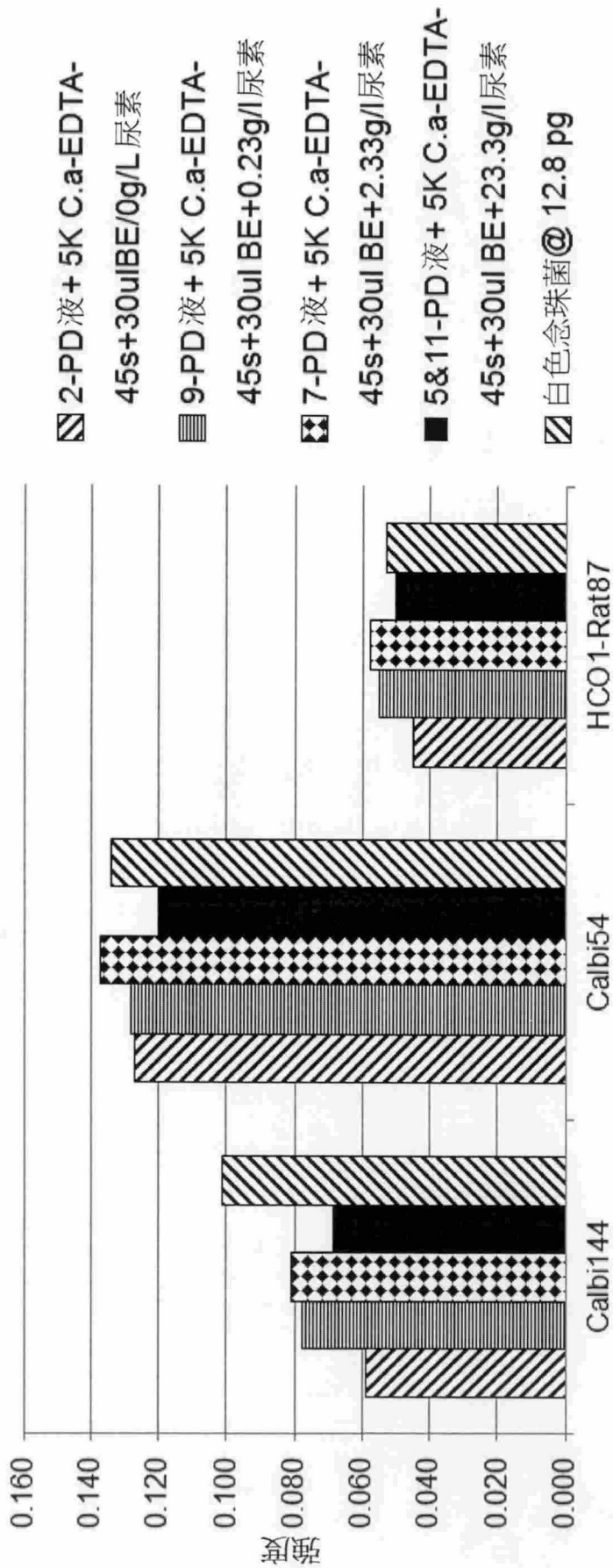


圖 7

血液中之白色念珠菌之矽石珠粒撞擊時程

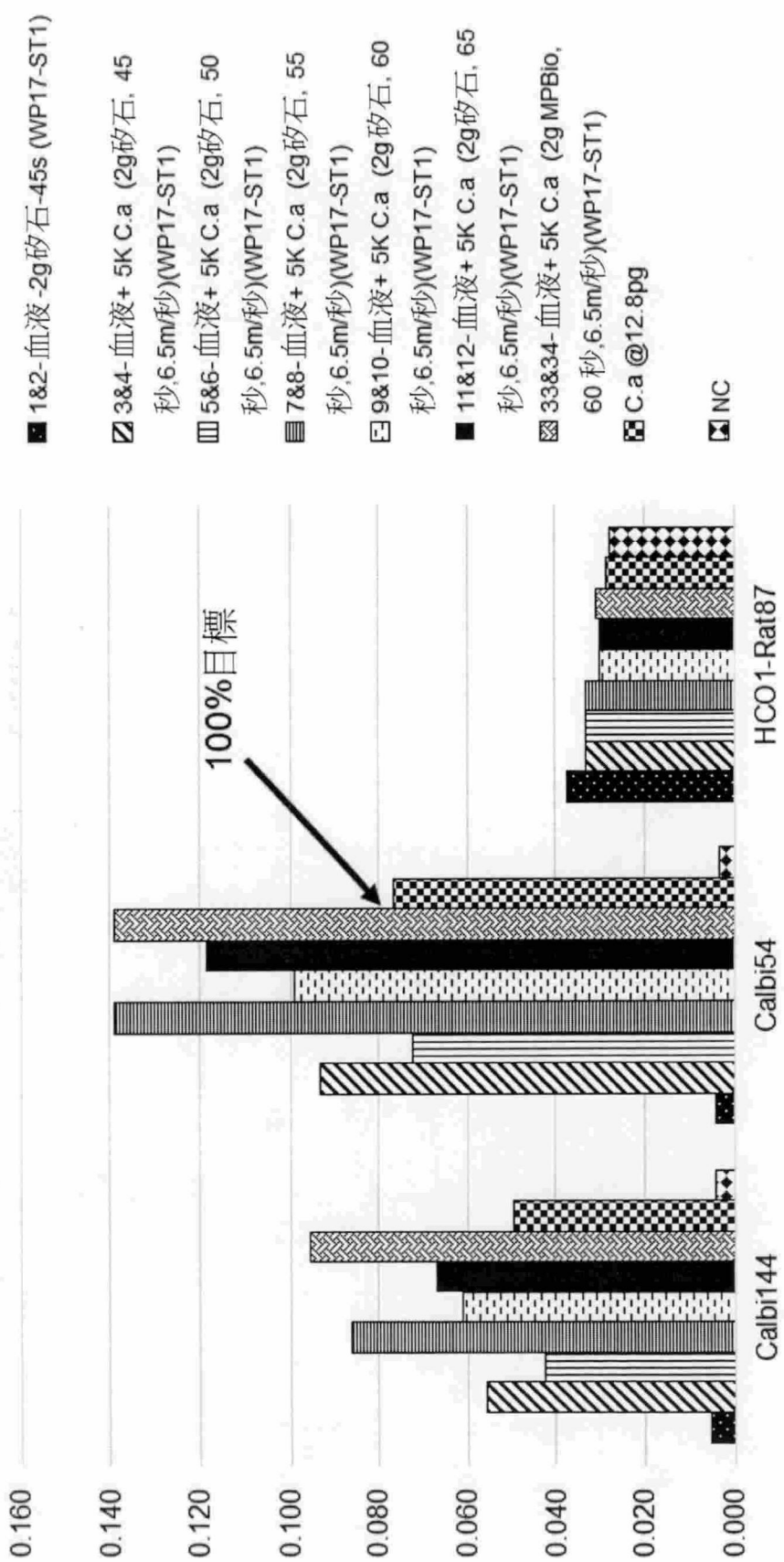


圖 8

# 血液中之金黃色葡萄球菌之矽石珠粒撞擊時程

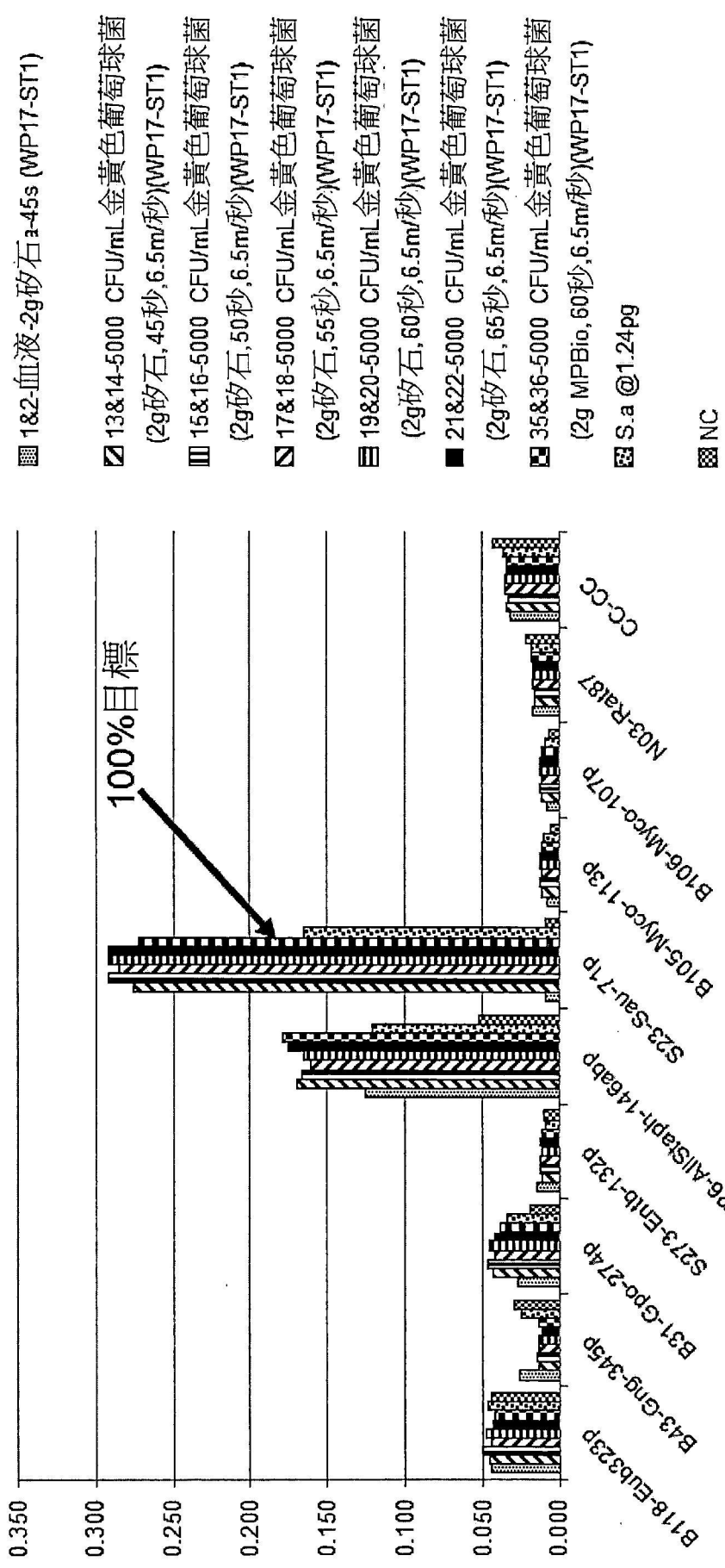


圖 9

血液中之大腸桿菌之矽石粒撞擊時程

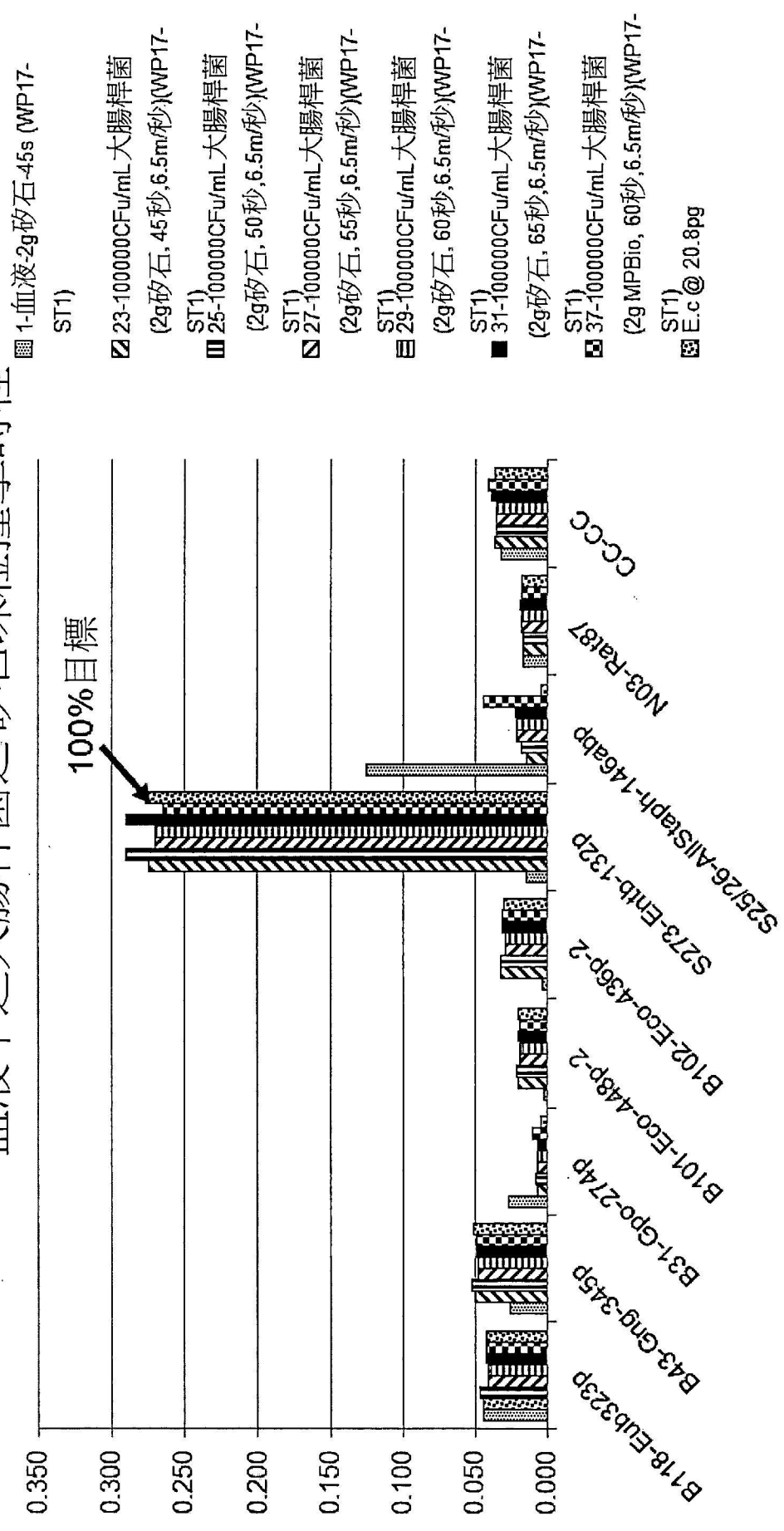


圖 10