

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日
2014年4月3日 (03.04.2014) WIPO | PCT

(10) 国际公布号

WO 2014/048263 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/10 (2006.01) *B01D 29/00* (2006.01)
B01D 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/083610
- (22) 国际申请日: 2013年9月17日 (17.09.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
 201210370414.4 2012年9月28日 (28.09.2012) CN
- (71) 申请人: 精专生医股份有限公司 (ACCUBIOMED CO., LTD) [CN/CN]; 中国台湾省新北市五股区五权路23号3楼, New Taipei City 248 (CN)。
- (72) 发明人: 李德政 (LEE, Te-Cheng); 中国台湾省新北市五股区五权路23号3楼, New Taipei City 248 (CN)。
- (74) 代理人: 北京天平专利商标代理有限公司 (WANG & ASSOCIATES); 中国北京市朝阳区朝外大街16号1号楼1206A室, Beijing 100020 (CN).
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: METHOD FOR PRESSURE EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS AND DEVICE THEREOF

(54) 发明名称: 气压式萃取核酸的方法及其装置

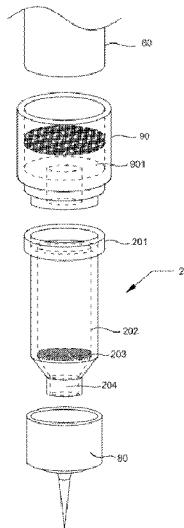


图3 / FIG. 3

(57) Abstract: The present invention relates to a novel method for extraction of nucleic acids and a device thereof, wherein in the method for pressure extraction of nucleic acids, a top end of a purifying tube is connected to a device which can apply either a positive or a negative gas pressure such that a specimen, a cleaning solution, and an eluent can be absorbed/discharged from a lower tip of the purifying tube, so as to achieve the effect of simple and convenient extraction of nucleic acids without a centrifuge.

(57) 摘要: 本发明有关一种新颖的抽取核酸的方法及其装置, 其利用气压式萃取核酸的方法, 在纯化管上端与一可施以正或负气体压力装置接合, 即可由纯化管下尖部吸取/排出检体、清洗液及冲提液, 达到不需要离心机即可简便抽取核酸的效果。

气压式萃取核酸的方法及其装置

技术领域

10 本发明有关一种抽取核酸的方法及其装置，特别是关于一种气压式抽取核酸的方法及其装置，以及利用该方法所设计的自动化机台。

背景技术

15 随着生物科技的发展以及遗传物质的解码，越来越多的生物相关实验室或医院甚至法医检验等等，皆频繁的使用抽取检体内的核酸来进行实验或检查。抽取并纯化核酸的方法很多，而目前最常见的方法分成三类：管柱萃取法、磁珠萃取法以及试剂萃取法，而试剂萃取法又分成两类，分别是有机溶剂萃取法和非有机溶剂萃取法。各种萃取方法皆有其优缺点，然而，管柱萃取法是目前操作上最安全简便且效果最佳的方式。

20 而利用该管柱萃取法的萃取流程又可分成两种，一种是管柱离心萃取法，另一种则为管柱真空萃取法。图1为习知的管柱离心萃取法，首先，装于微量离心管10内的处理过的检体(如利用阴离子清洁剂将细胞打破释放出核酸，并使蛋白质变性)转置于一纯化管20中，该纯化管20通成可分成三部分，上颈部201、中间管体部202，以及下尖部204；中间管体部202的底部具有纯化膜203，而下尖部204则具通道可使液体流出，通常检体是利用微量分注器(pipette)将微量离心管10内的检体吸取后，由纯化管20的上方注入至纯化管20中。纯化管20外套有一废液管30，将套合而为一体的第一双管置于离心机中离心，由于核酸带负电，会与带正电的纯化膜203结合而吸附于其上，而其它杂质则会因为离心力的关系而穿透纯化膜203且通过纯化管20的下尖部的通道而流到废液管30内，此步骤称为「结合步骤」；接着，于纯化管20内加入清洗液后再次离心，使纯化膜203上的杂质被离心出来提高核酸的纯度，此步骤称为「清洗步骤」；最后，将纯化膜203上带有核酸的纯化管20转置到收集管40中，加入特殊盐度及pH值的冲提液改变纯化膜203的电性，并再度离心，使核酸与纯化膜203分离而流出，收集核酸于收集管40中，此步骤称为「收集步骤」。管柱离心萃取法需要经过至少三次的离心，过程较为繁复且萃取时间会因等离心而拉长。虽然市面上已有自动化的管柱离心萃取机台，但由于机台内必须设有离心设备，因此机台通常体积较大，且其萃取较为耗时的缺点并未克服。

另外一种管柱真空萃取法如图2所示，其原理也与管柱离心萃取法雷同，只是其「结合步骤」以及「清洗步骤」的步骤是用真空吸引取代离心方式，其直接将

5 纯化管20插入压力盒50中，利用气体压力，给予负压使液体流出纯化管20而直接进入液体收集瓶(未图示)，但是在最后的「收集步骤」仍然必须利用离心方式将核酸收集至收集管40中。因此，即便是自动化机台，也必须要有离心设备设置于其中。

10 综上所述，目前市面上虽然已有许多厂商研发出各种的管柱萃取套组及自动化机台，但其原理及萃取流程皆与上述的习知技术雷同，其存在的体积大且耗时较久的缺陷尚未被克服，因此，本技术领域中尚需一种新的方式及机台来克服这些缺点。

发明内容

15 为了解决上述萃取核酸所产生耗时且耗费人力的问题，以及自动化机台体积过大等的缺陷，本发明人出人意料地发想，利用习知的纯化管，直接在纯化管中利用气压的方式，完全仅利用纯化管的下端抽吸及排放检体、清洗液、冲提液等，完全不需要利用离心机，且不需要从纯化管上颈部处注入检体、清洗液或冲提液，即可有效地萃取核酸。因此，本发明人提供了一种气压式抽取核酸的方法及其装
20 置，以及利用该方法所设计的自动化机台。

本文中术语「一」及「一种」代表于本文中的语法对象有一个或多于一个(即至少一个)。

本发明的一方面提供一种气压式萃取核酸的方法，其包含：(a)将一纯化管上端与一可施以正或负气体压力的压力设备气密接合，其中该纯化管为具有半透膜的通孔管体；(b)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的下端吸取含有核酸的检体，使该检体通过该半透膜后，该核酸与该半透膜电性或极性结合；(c)开启该压力设备对该纯化管施以正气压，使残余检体以相反于步骤(b)的方向通过半透膜后，由纯化管的下端流出，且其中该步骤(b)及(c)可仅进行一次或重复进行多次；(d)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的下端吸取冲提液，使该冲提液通过半透膜后，改变该半透膜电性或极性使核酸与半透膜分离并溶于冲提液中；及(e)开启该压力设备对该纯化管施以正气压，使该溶有核酸的冲提液相反于步骤(d)的方向通过半透膜后，由该纯化管的下端排出并收集，且其中该步骤(d)及(e)可仅进行一次或重复进行多次。

35 本文中术语「纯化管」为技术领域中习知的用于纯化核酸的管柱，通常而言其包含一上颈部、一中间管体部、一半透膜以及一下尖部，该下尖部具有一通孔而可用于排出液体，但本发明中的该纯化管并不限于此结构，只要该纯化管为具有半透膜的通孔管体即在本发明的范围内，管体的材料可为塑料如聚丙烯、聚苯乙酰、聚碳酸酯或聚氯乙烯等，或生物可降解性材料。该半透膜亦已为技术领域

5 中所习知，该材质可为二氧化硅，表面电荷带有正电，可与检体中带负电的核酸
电性结合，并受冲提液改变其电性后，释放核酸；于本文中，该「半透膜」又称
「纯化膜」，为可使溶液由其内部通过，亦即，当在与半透膜的一面接触的空间
与该半透膜的另一面空间之间存有压力差时，溶液可由高压空间往低压空间流动
而穿透该半透膜；或者，当该半透膜受到离心力时，溶液可沿着离心力的方向穿
透该半透膜，但核酸则与该半透膜作用而吸附于该膜上；而本发明中所使用的半
透膜透过该膜与核酸之间的相互作用来吸附核酸，其中，核酸与半透膜是透过极
性或电性而互相吸引，于本发明的较佳实施例中，该半透膜为具有亲水性基团的
多孔膜(又称亲水性膜)，且推测核酸的亲水性基团与半透膜的亲水性基团透过改变
周围的极性而互相吸引；本文中所称的具有亲水性基团的半透膜是指构成多孔膜
10 材料本身具有亲水性基团(如聚丙烯酸羟乙酯、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚乙烯醇、
聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚氧乙烯、醋酸纤维素、醋酸纤维
素皂化物、醋酸纤维素混合物等，优选可使用具有羟基的有机聚合物)，或者是对
构成多孔膜的材料进行处理或涂敷，从而引进亲水性基团，而任意的有机或无机
材料均适合做为该多孔膜的材料，也可以是多种多孔膜的组合；所述的多孔膜中，
15 为了能使溶液由内部通过，因此该膜的孔径优选为大于或等于0.2μm，厚度优选为
10 μm至500 μm，更佳为50 μm至250 μm。又本文中，纯化管的上端及下端的定义
为，一般的纯化管结构中，较靠近该纯化膜位置者为下端，而远离该纯化膜位置
者为上端，但本发明并不限于此，而以与压力设备接合处者称为纯化管的上端，
20 而用于吸取液体者称为纯化管的下端。
25 本文中术语「可施以正或负气体压力的压力设备」包含任何装置可提供正或
负气体压力者，最简易的装置如唧筒，可藉由抽或压该唧筒体内的推杆而提供正
或负气体压力；抑或如习知技术中的针筒、移液器、泵或气压缸，其包含一气
压阀以及一压力器，可受控制而产生正或负气体压力，其中，使溶液可穿透半透
膜的压力值为10kPa至300kPa，优选为40kPa至200kPa，最优选的压力值为60kPa。

30 在本发明的一实施例中，为了可进一步洗掉半透膜上的杂质，而可纯化萃取出的核酸，因此，本发明上述的方法的步骤(c)及(d)之间可进一步包含清洗步骤，
该清洗步骤包含：(c-1)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的
下端吸取清洗液，使该清洗液通过该半透膜；及(c-2)开启该压力设备对该纯化管
施以正气压，使该清洗液以相反于(c-1)的方向通过半透膜后，由纯化管的下端流
35 出。

本文中术语「清洗液」包含习知技术中任何可用于清洗纯化管的液体，其包含但不限于水、酒精或其他不会改变半透膜电性或极性的缓冲液，亦即该清洗液能够洗出核酸混合物溶液中的杂质，该杂质是与核酸一起吸附于该半透膜上，就

5 此方面而言，该清洗液仅使杂质由半透膜上被冲提，而不会使核酸被冲提，为达到此目的，由于核酸难溶于水性的有机溶液，因此使用适合的水性有机溶液，皆在本发明的范围当中，例如醇类，包含甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇或丁醇，优选为乙醇。

10 本文中术语「充提液」包含习知技术中任何可用于将核酸由该半透膜上解离的液体，其包含可将半透膜的极性或电性改变，而使核酸由其上解离下来的液体，例如为含有1.2 M NaCl、50mM 3-（N-吗啉）丙磺酸(MOPS)、15%乙醇且pH 8.0的缓冲液；或如为含有0.5M乙酸铵、10mM乙酸镁(pH7.5)及1.5mM EDTA的缓冲液；或如为含有1.25M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.5及15% 异丙醇的缓冲液等。

15 为了避免纯化管内的检体受到负气压的吸取，冲到压力设备上造成污染，在本发明的一较佳实施例中，该纯化管上端与该压力设备中间可进一步设有一具滤膜的转接头，当然，该转接头与纯化管上端以及压力设备气密接合。此外，为了使吸取液体或收集液体时更方便操作，在纯化管下端可进一步设有与其气密接合的移液器吸管(tip)，藉此，纯化管可利用该移液器吸管吸取少量的液体或是将纯化的检体收集到微离心管中，以利保存或进一步的实验。在本发明较佳的实施例中，
20 该移液吸管上端结构为一套体，该套体可气密地包覆该纯化管部分的中间管体至下端处，使其套合于该纯化管，且该移液吸管与该纯化管接合处的结构与不同厂牌的纯化管具有通用性，而可广泛应用于各类型的纯化管，该手段例如但不限于该移液吸管的套体与该纯化管接合处的结构使用橡胶材质，使其为弹性结构，而可与不同规格的纯化管接合；或该套体部分具有两层不同的斜度，第一层靠近纯化管中间管体的斜度较平缓，第二层靠近纯化管下端的斜度较陡，利用此两层不同的斜度而使其可适用并气密地套合于市面上各种厂牌的纯化管。
25

30 依据本发明的方法，在萃取检体内的核酸时，完全不需要如同先前技术一样，必须使用离心机离心掉废液或是冲提液；反之，仅需要简单地利用正负气压，而使纯化管抽吸或排放的动作，就可简便地纯化出检体内的核酸；此外，也不需要如同先前技术一般必须利用微量分注器由纯化管的上颈部开口加入检体、清洗液或是冲提液，反之，本发明的方法都是从纯化管的下端直接吸取检体、清洗液或是冲提液即可。

35 本发明的另一方面提供一种气压式萃取核酸的装置，其包含：一针筒，该针筒包含一筒体、设置于该筒体内的一推杆，其特征在于该筒体内的推杆下方设有一可与核酸电性或极性结合的半透膜。其中，该装置可进一步包含一可拆卸式地与筒体结合的一针头组件。

藉由本发明的装置，使用者可利用推杆上拉时所产生的负气压，使针头产生吸力而可吸取检体，当检体通过针头进入体内时，检体内带有负电的核酸会与半

5 透膜电性或极性结合，而残余的检体此时可藉由推动推杆产生的正气压，而由针头排出，此为「结合步骤」，该「结合步骤」可重复一至多次，而可提高检体内核酸结合至该半透膜的效率；接着，再次将推杆上拉，并由针头吸取清洗液，使纯化膜上的杂质被受清洗后而可提高核酸的纯度，清洗后再推动推杆产生的正气压，将清洗液由针头排出，此步骤称为「清洗步骤」，该清洗步骤可依照需求重
10 复一到多次；最后，再次将推杆上拉，并由针头吸取冲提液，使特殊盐度及pH值的冲提液改变纯化膜的电性或极性，让核酸由半透膜上冲提出来而溶于冲提液中，此时，即可将推杆推动使溶有核酸的冲提液经由针头排出而收集于收集管中，此
15 步骤称为「收集步骤」，该「收集步骤」亦可重复一至多次，而可提高检体内核酸回收的效率。藉由本发明的装置，使用者完全不需要使用真空装置或离心机，即可简便地由检体中抽取出核酸，且先前技术中，所有的液体材料均为一次性通过膜后，液体即被吸走或排掉，而无法反复通过该半透膜来提高核酸萃取的效率，但本发明克服了该缺陷，透过本发明的装置，可简便地将液体材料反复通过半透膜，而有效地提高核酸萃取量。

本发明的再一方面提供一种使用本发明的方法萃取核酸的气压式萃取核酸的自动化机台，其包含一主机台，具有运作所需的电子零件组、一移动装置，与该主机台电性相连、一唧筒，与该主机台电性相连以及一操作台，与该主机台电性相连，该操作台包含一纯化套组。在本发明的一较佳实施例中，该自动化机台可进一步包含一加热模组及/或一振荡器，使检体在操作过程中可选择性地受振荡或加热，以提高核酸纯化的产量。
20

于本发明一实施例中，该纯化套组包含：(a)一具有半透膜的纯化管、(b)一具
25 滤膜的转接头、(c)一移液器吸管、(d)一用于容置检体的孔盘、(e)至少一个用于容置缓冲液的孔盘；及(f)一用于容置萃取后产物的孔盘。其中，上述套组中的(a)至(c)组件可为一体成形者，于本发明的一较佳实施例中，该纯化套组一体排列为一行纯化匣的形式。

根据本发明的气压式萃取核酸的自动化机台，其中该移动装置较佳为机械手臂，可用于移动唧筒及/或移动纯化套组，唧筒前方具有尖端用于组合该纯化套组内的转接头、纯化管以及移液器吸管(由上往下的顺序)，当此三者组合完毕(以下简称组合件)，唧筒与组合件气密接合后，即可提供负气压使移液器吸管吸取纯化套组内检体孔盘中的检体至纯化管中，使检体中的核酸与其内的半透膜电性或极性反应，且转接头可避免检体上冲至唧筒，而避免污染，当反应完成后，唧筒给予正气压，纯化管可将残余检体经由移液器吸管直接排入纯化套组内检体孔盘，而此步骤可重复一至多次，以提高核酸结合至半透膜的量；接着，机器手臂机械式地带动组纯化套组中装填有清洗液的孔盘至唧筒上套合的组合件下方，唧筒提
30
35

5 供负气压使移液器吸管吸取清洗液至纯化管中，经清洗后，唧筒提供正气压，将清洗液排入原先吸取出来的同一孔盘中，此清洗步骤可重复一至多次；最后，机器手臂机械式地带动纯化套组中装填有冲提液的孔盘上端至该唧筒上套合的组合件下方，提供负气压使移液器吸管吸取冲提液至纯化管中，使电性结合于半透膜上的核酸溶出至冲提液中，接着唧筒提供正气压，将冲提液排入原先吸取出来的
10 同一孔盘中，或是机器手臂可机械式地带动纯化套组的另一收集孔盘中至该唧筒上套合的组合件下方，收集所纯化的核酸，此步骤亦可重复一至多次，以提高核酸萃取量。依据本发明的气压式萃取核酸的自动化机台，其纯化套组可依照不同的需求而设计，如该孔盘可依照实验所需的清洗次数，增加缓冲液的孔盘，该缓冲液为细胞溶解液、清洗液、酒精、水或冲提液等等，皆在本发明的范围之内。

15 藉由本发明的气压式萃取核酸的自动化机台，该机台不仅不需要离心机的设备设置于其中，且仅需要简便的移动装置以及可提供正或负气压的唧筒，即可以真空方式抽吸检体以及反应液体，不仅时间上可省略离心所需的时间，且在配置整个机台的反应行程亦较为简单，因为唧筒仅需要简单的抽吸，只需要走同一列的直线即可由最前端的结合步骤到最后的冲提步骤，且中间各种步骤须要重复多次也均可执行，且反应可在一体排列为一行纯化匣的纯化套组内完成，而不像传统的自动化离心机萃取核酸机台，因为离心的关系，机械手臂可能会横越多个方向抓取检体，提高污染率；更有甚者，本发明的转接头和移液吸管具有通用性，因此不必再开发新的纯化管，而可利用习知的各种厂牌纯化管即可。因此，本发明的气压式萃取核酸的自动化机台改良了习知技术的机台缺陷，且提供了一种新颖、简便但效率更高的自动化技术。
20
25

在本发明的技术领域中存在有一种技术偏见，亦即本发明所属技术领域的技艺人士通常认为，须要将具有核酸的检体，由纯化管上端提供，而使其中的核酸与半透膜结合后，残余检体由纯化管的另外一端(纯化管下端)排出；然而，本发明克服了技术偏见，在对该纯化管提供具有核酸的检体之前，便先将纯化管一端(纯化管上端)与压力设备结合，而使萃取核酸时所须用到的所有液体材料(包含具有核酸的检体、核酸已被半透膜吸附的残余检体、清洗液、废弃清洗液、充提液或溶有核酸的充提液)均仅由纯化管的另一端(纯化管下端)进出。使用本发明的方法的优点在于，由于所有液体材料仅由纯化管的一端进出，此外，由于当该具有核酸的检体由纯化管下端吸取而通过半透膜后，核酸先与该半透膜结合，而当对该纯化管施以正气压，将该检体排出时，检体又会再通过一次半透膜并于纯化管下端排出，若有残余未与该半透膜结合的核酸，可有再次的机会与半透膜结合，因此，于本发明中操作一次的结合步骤，实际上已经重复了两次的结合步骤；而清洗步骤以及收集步骤亦为相同原理，于本发明中操作一次的清洗或收集步骤中，实际
30
35

5 上已经重复了两次的清洗和收集步骤，故而萃取核酸的量会增加，且效率更高。此外，在萃取过程中还可反复利用压力装置提供的正/负气压，使萃取所用的液体可反复通过半透膜，又进一步增进核酸结合、清洗或冲提的效率，有效提升核酸的萃取量；相较于先前技术中，所有反应液体均是一次性地通过半透膜，而液体即被排掉或抽走，但本发明的方法则可增进萃取量且提高萃取效率。

10 再者，使用本发明的方法以及装置，所有使用的液体材料均可「原位吸取/排除」，亦即，萃取过程中的液体材料由何处被吸取，即可排回其被吸取之处或其他所欲的容器中，而不须使用特出的废液桶进行收集。因此，若使用一行的纯化匣时，而当萃取核酸结束后，所有的废液均还是回到其原本于纯化匣中的位置，而可直接将该使用过后的纯化匣丢弃，不仅方便且亦可减少交叉污染的风险。

15

附图说明

图1：显示习知的管柱离心萃取法萃取核酸流程图。

图2：显示习知的管柱真空萃取法萃取核酸流程图。

图3：为本发明的气压式萃取核酸装置的一实施例示意图。

20

图4：为本发明的气压式萃取核酸装置的另一实施例示意图。

图5：为本发明的气压式萃取核酸的自动化机台中所使用的纯化套组示意图。

具体实施方式

首先，参见图3，其发明的气压式萃取核酸装置的一实施例示意图。该气压式萃取核酸装置包含一纯化管20以及一可施以正或负气体压力的压力设备60。该纯化管20上端与该压力设备60气密接合，而该纯化管由上而下分别为一上颈部201、一中间管体部202、一纯化膜203以及一下尖部204，该下尖部204具有一通孔。藉由该装置，首先进行「结合步骤」：开启该压力设备60对该纯化管20施以负气压，该纯化管20的下尖部204吸取含有核酸的检体，使检体通过该纯化膜203，而使该核酸与该纯化膜203电性或极性结合；开启该压力设备60对该纯化管20施以正气压，使残余检体以相反方向再度通过该纯化膜203后，由纯化管20的下尖部204流出，此步骤可视需要重复一至多次。

接着进行「收集步骤」：开启该压力设备60对该纯化管20施以负气压，利用该纯化管20的下尖部204吸取冲提液，使该冲提液通过纯化膜203后，改变该纯化膜203电性或极性使核酸与纯化膜203分离并溶于冲提液中；开启该压力设备60对该纯化管20施以正气压，使该溶有核酸的冲提液以相反方向再度通过该纯化膜203后，由该纯化管20的下尖部204排出并收集，此收集步骤可视需要重复一至多次。而使用者可依据需要，在结合步骤完成后进一步进行一至多次的清洗步骤。

5 根据本发明的气压式萃取核酸装置，该纯化管20可利用各种习知技术中已存在的纯化管，市面上不同厂牌的纯化管均可利用于本发明。再者，为了避免纯化管20内的检体受到负气压的吸取，冲到压力设备60上造成污染，图中可见，该纯化管20上端与该压力设备60中间可进一步设有一具滤膜901的转接头90，该转接头90与纯化管20上端(即上颈部201)以及压力设备60气密接合。此外，为了使吸取液体或收集液体时更方便操作，在纯化管20下尖部204可进一步设有与其气密接合的移液器吸管80，藉此，纯化管20可利用该移液器吸管80吸取少量液体或将纯化的检体收集到微离心管中。

10 由图中可见，在本发明较佳的实施例中，该移液吸管80上端可进一步具备一套体，该套体可气密地由该纯化管部分的中间管体202至下尖部204处套合，据此，
15 使该移液吸管80可广泛应用于各种不同类型的纯化管；此外，为使该转接头90与该移液吸管80与该纯化管接合处的结构与不同厂牌的纯化管具有通用性，可将该转接头90与该移液吸管80与该纯化管20接合处的结构使用橡胶材质，使其为弹性结构，而可与不同规格的纯化管20接合。在本发明中，由于元件间皆必须气密接合，
20 才可利用气压式方式萃取核酸。各个元件间气密接合的方式可使用任何习知的技术，如增设O型环等方式，并未有所限制。

接着，请参见图4，其为本发明的气压式萃取核酸装置的另一实施例示意图。可见该气压式萃取核酸装置可为一针筒70，该针筒70即系一种可施以正或负气体压力的压力元件。该针筒70包含一筒体701、设置于该筒体701内的一推杆702及可拆卸式地与筒体701接合的一针头组件703，其特征在于该筒体内701的推杆702下方设有一可与核酸电性结合的纯化膜203。藉由本发明的装置，可依循上述的方法，直接使用该针筒70利用推杆702的抽吸及推排，进行「结合步骤」、「清洗步骤」以及「收集步骤」；详言之，先利用推杆702上拉时所产生的负气压，使针头组件703吸取检体，当检体通过针头进入筒体701内时，检体由下往上通过该纯化膜203，检体内带有负电的核酸会与纯化膜203电性或极性结合，而残余的检体藉由推动推杆702产生的正气压，由上往下再度通过该纯化膜203后由针头排出，完成「结合步骤」；接着，再次将推杆702上拉，并由针头组件703吸取清洗液，该清洗液由下往上通过该纯化膜203，使纯化膜203上的杂质被受清洗后而可提高核酸的纯度，并再度推动推杆702产生的正气压，将清洗液由上往下通过该纯化膜203后由针头排出，完成「清洗步骤」，该清洗步骤可依照需求重复一到多次；最后，再次将推杆702上拉，并由针头吸取冲提液，该冲提液由下往上通过该纯化膜203，使特殊盐度及pH值的冲提液改变纯化膜203的电性或极性，让核酸由半透膜上冲提出来而溶于冲提液中，并将推杆702推动使溶有核酸的冲提液由上往下通过该纯化膜203后经由针头排出而收集于收集管中，完成「收集步骤」。

5 本发明的另一方面利用本发明的方法所设计的气压式萃取核酸的自动化机台(未图示), 其包含一机械手臂、一组或一组以上的唧筒以及一操作台, 且该操作台包含一纯化套组150。在本发明的一较佳实施例中, 该自动化机台可进一步包含一加热模组及/或一振荡器, 使检体在操作过程中可选择性地受振荡或加热, 以提高核酸纯化的产量。

10 图5为于本发明一实施例中的纯化套组150示意图, 该纯化套组150包含: 一具有一上颈部、一中间管体部、一半透膜以及一下尖部的纯化管20、一具滤膜的转接头90、一移液器吸管80、一用于容置检体的孔盘(简称检体孔盘100)、至少一个用于容置缓冲液的孔盘(简称缓冲液孔盘120); 及一用于容置萃取后产物的孔盘(简称产物孔盘110)。

15 根据本发明的气压式萃取核酸的自动化机台, 其机械手臂上具有唧筒, 唧筒前方具有尖端用于组合该纯化套组150内的转接头90、纯化管20以及移液器吸管80(由上往下的顺序), 当此三者组合完毕(以下简称组合件), 唧筒可与组合件气密接合后, 提供负气压使移液器吸管80吸取纯化套组150内检体孔盘100中的检体至纯化管中, 使检体中的核酸与其内的半透膜电性或极性反应, 且转接头90可避免检体上冲至唧筒, 而避免污染, 当反应完成后, 唧筒给予正气压, 纯化管20将残余检体经由移液器吸管80直接排入纯化套组150内检体孔盘100(此为「结合步骤」), 其中, 于该结合步骤中, 可重复将该检体通过该纯化管20一至多次, 提高核酸结合于半透膜的量; 接着, 机器手臂机械式地带动组合件至纯化套组150中装填有清洗液的孔盘上端(即缓冲液孔盘120), 提供负气压使移液器吸管80吸取清洗液至纯化管20中, 经清洗后, 唧筒提供正气压, 将清洗液排入原先吸取出来的同一孔盘中(此为「清洗步骤」), 该清洗步骤可重复一至多次; 而当清洗步骤结束后, 可进一步将该纯化管20以加热机构加热以蒸散清洗液中的乙醇, 及/或透过多次的以唧筒提供正/负气压使该半透膜干燥; 最后, 机器手臂机械式地带动组合件至纯化套组150中装填有冲提液的孔盘上端(即缓冲液孔盘120), 唧筒提供负气压使移液器吸管吸取冲提液至纯化管20中, 使电性/极性结合于半透膜上的核酸溶出至冲提液中, 接着唧筒提供正气压, 将冲提液排入原先吸取出来的同一孔盘中, 或是机器手臂可机械式地带动组合件至纯化套组150的产物孔盘110中, 收集所纯化的核酸(此为「收集步骤」), 该收集步骤可重复一至多次, 亦即, 将同一冲提液重复通过该半透膜上一至多次, 使核酸的萃取量可有效提高。

30 该纯化套组150可为两个分开的组件, 亦可形成一体成型的组件, 并未限制, 较佳一体成型者为佳。此外, 纯化套组150中的缓冲液孔盘120可根据需求而有不同的数量, 但其排列方式最佳为根据萃取核酸时的步骤, 依序为细胞溶解液、清洗液、酒精、水或冲提液, 藉此, 当点胶机带动组合件移动时, 可有顺序地一步

5 步直线移往后方进行核酸萃取。

此外，由于该含有核酸的检体通常包含溶解缓冲液(lysis buffer)以打破检体中所含细胞的细胞膜而使其释放出核酸，该缓冲液中含有大量的界面活性剂，故而当「结合步骤」进行完毕后，将残余检体排出时，若排出至空的孔盘中，容易产生大量气泡而不利于操作，因此，于一较佳的实施例中，该纯化套组150可包含一用于容置该残余检体的孔盘(图中未示)，且其中该孔盘中包含100% EtOH，则该EtOH可吸收气泡，使该残余检体排出至该孔盘时不会产生气泡；其中，EtOH的量并无限制，但较佳为100至500μl，更佳为200至400 μl，最佳为300 μl。

再者，当「结合步骤」进行完毕后，由于该半透膜上可能有残存的检体，因此，若直接吸取清洗液，容易产生较多气泡，故而可先吸取一次100% EtOH，将半透膜上的残余检体清除干净，也增加该半透膜的通透性，而能使下一清洗步骤的清洗液较好通过该半透膜，增进该清洗效率，因此，该纯化套组150可包含：含有100% EtOH的孔盘(图中未示)于该缓冲液孔盘120之前，其中，EtOH的量并无限制，但较佳为100至500μl，更佳为200至400 μl，最佳为300 μl。

以下实施例不应视为过度地限制本发明。本发明所属技术领域中具有通常知识者可在不背离本发明的精神或范畴的情况下对本文所讨论的实施例进行修改及变化，而仍属于本发明的范围。

[实施例] 纯化鱼肝脏的gDNA

前置作业

所有的试剂均使用QIAamp DNA试剂套组(凯杰生物科技有限公司(Qiagen Taiwan Co. Ltd.))中所附者，内含组织溶解液、细胞溶解液、清洗液I、清洗液II、冲提液及蛋白质分解酶K (proteinase K)，以及纯化管，其中该纯化管中的半透膜为二氧化硅(silica)膜。

取约5x5mm大小的鱼肝脏，置入2ml的螺盖试管，加入800μl磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)以及一颗5mm钢珠，以组织均质机均质化30秒。接着，加入800μl细胞溶解液，以振荡器混匀，再加入80μl蛋白质分解酶K，并使用振荡器混匀。于60°C下培育30分钟使检体溶解。之后，加入800μl的乙醇并以振荡器振荡30秒。于13000rpm下离心3分钟，各取200μl上清液至四个样品管中，分别为实施例1检体、实施例2检体、比较例1检体及比较例2检体。

实施例1

首先，先将纯化管上颈部与一针筒气密接合，纯化管下尖部与一移液器吸管气密接合。

结合步骤：拉动针筒的推杆，将实施例1样品管中的实施例1检体经由该移液器吸管的吸取，由纯化管的下尖部通过纯化膜后，吸取至中间管体部，接着，将

5 针筒推杆下推，排出未与纯化膜结合的残余检体，而核酸则电性结合于纯化膜。

清洗步骤：拉动针筒的推杆，将500 μ l清洗液I经由该移液器吸管的吸取，由纯化管的下尖部通过纯化膜后，吸取至中间管体部，接着，将针筒推杆下推，排出该已清洗过纯化膜的清洗液I。同样的再一次进行清洗步骤，将750 μ l清洗液II由经由该移液器吸管的吸取，由纯化管的下尖部通过纯化膜后，吸取至中间管体部，
10 接着，将针筒推杆下推，排出该已清洗过纯化膜的清洗液II。

后清洗步骤：拉动针筒的推杆，将800 μ l的100%酒精经由该移液器吸管的吸取，由纯化管的下尖部通过纯化膜后，吸取至中间管体部，接着，将针筒推杆下推，排出该已清洗过纯化膜的酒精；此步骤重复两次。接着，将针筒抽吸并推排至少15次，使残于在纯化管内的酒精挥发。

15 收集步骤：拉动针筒的推杆，将200 μ l冲提液经由该移液器吸管的吸取，由纯化管的下尖部通过纯化膜后，吸取至中间管体部，并静置3分钟，接着，将针筒推杆下推，排出该溶有核酸的冲提液至1.5ml的微量离心管中。

实施例2

实施例2的步骤与实施例1一样，重复实施例1的步骤，仅将检体换为实施例2
20 检体。

比较例1

依据QIAamp DNA试剂套组产品说明书，进行核酸萃取。结合步骤：利用微量分注器(pipette) 将比较例1检体吸取至纯化管内，检体由纯化管上方注入。接着，在纯化管下方装一废液管，两管件一起至离心机中于转速13000rpm下离心2分钟，
25 残余检体将通过纯化膜而经由纯化管下尖部的通道离心至废液管中，离心完后，倒掉废液管中的废液，而核酸电性结合于纯化膜上，纯化管再套回废液管中。

清洗步骤：利用微量分注器将500 μ l清洗液I吸取至纯化管内，清洗液I由纯化管上方注入。两管件一起至离心机中于转速13000rpm下离心1分钟，清洗液I通过纯化膜而经由纯化管下尖部的通道离心至废液管中，离心完后，倒掉废液管中废液，纯化管再套回废液管中。同样的再一次进行清洗步骤，将750 μ l清洗液II吸取至纯化管内，清洗液II由纯化管上方注入。两管件一起至离心机中13000rpm离心1min，清洗液II通过纯化膜而经由纯化管下尖部的通道离心至废液管中，离心完后，倒掉废液管中废液，纯化管再套回废液管中。

后清洗步骤：将两套件于转速13000rpm下离心额外的三分钟以确保将清洗液
35 完全移除。

收集步骤：移除废液管，并换上1.5ml的微量离心管套于纯化管外。利用微量分注器将200 μ l冲提液吸取至纯化管内，冲提液由纯化管上方注入至中间管体部，并静置3分钟，接着，将两套件置入离心机中于转速13000rpm下离心1分钟以获得

5 该溶有核酸的冲提液至1.5ml的微量离心管中。

比较例2

比较例2的步骤与比较例1一样，重复比较例1的步骤，仅将检体换为实施例2检体。

以上实施例1、2以及比较例1及2的抽取出的gDNA的结果汇整于下表1中。

10

表1

样品	浓度(ng/ul)	A260 吸光值	A280 吸光值	A260/A280
实施例 1	448.93	8.979	4.266	2.10
实施例 2	503.85	10.077	4.807	2.10
比较例 1	418.70	8.374	3.938	2.13
比较例 2	386.94	7.739	3.641	2.13

由上表1可见，使用本发明的方法及装置所抽取出的DNA浓度与使用习知方式所收取出的DNA浓度差不多，且方法较为简便。

15 此外，本发明的方法及装置可适用于不同厂牌的抽取核酸的纯化管套组。

接着，为了比较使用亲水性膜与疏水性膜对于本发明的方法的影响，且为了比较使用本发明的装置与传统离心方式的影响，进一步使用不同厂牌的半透膜并利用本发明的装置以及使用传统离心方式，进行核酸萃取试验。

实施例3

20 实施例3的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为PALL公司的一种亲水性二氧化硅膜(品名：Glass Fiber Media)，膜孔径为1.0μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

实施例4

25 实施例4的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为PALL公司的亲水性硝化纤维膜(品名：BioTrace)，膜孔径为0.2 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

实施例5

30 实施例5的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为Advantec公司的亲水性硝化纤维膜(品名：Mixed Cellulose Esters)，膜孔径为0.2 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为

5 60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

实施例6

实施例6的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为Advantec公司的亲水性醋酸纤维素膜(品名：Cellulose Acetate)，膜孔径为0.45 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为
10 60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

比较例3

比较例3的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例3所使用的半透膜。

比较例4

15 比较例4的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例4所使用的半透膜。

比较例5

比较例5的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例5所使用的半透膜。

20 比较例6

比较例6的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例6所使用的半透膜。

以上实施例3至6以及比较例3至6的抽取出的gDNA的结果汇整于下表2中。

25 表2

实施例	半透膜材质	萃取 DNA 量(ng)	A260/A280
实施例 3	亲水性二氧化硅	7.1	1.71
实施例 4	亲水性硝化纤维	5.5	1.71
实施例 5	亲水性硝化纤维	5.6	1.68
实施例 6	亲水性醋酸纤维素	6.3	1.70
比较例 3	亲水性二氧化硅	6.7	1.77
比较例 4	亲水性硝化纤维	5.8	1.75
比较例 5	亲水性硝化纤维	5.9	1.75
比较例 6	亲水性醋酸纤维素	5.9	1.75

由表2中可见，使用本发明的装置所萃取出的核酸萃取量较习知技术为高，此系因使用本发明的装置时，由于液体材料仅由纯化管的下端进出，因此，在收集

5 步骤中可重复利用压力装置提供的正/负气压，使冲提液反复通过半透膜，而增进核酸冲提的效率，而有效提升核酸的萃取量。相较于使用离心的方式，所有反应液体均是一次性地通过半透膜，而液体即被排除，使用本发明的方法及装置可增进萃取量且提高萃取效率。

比较例7A

10 比较例7A的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为PALL公司的疏水性羧化聚偏二氟乙烯(品名：Fluoro Trans G)，膜孔径为0.2 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

比较例8A

15 比较例8A的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为PALL公司的疏水性尼龙((品名：Hydrolon)，膜孔径为1.2 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

比较例9A

20 比较例9A的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为PALL公司的疏水性聚醚砜(品名：Supor-450PR)，膜孔径为0.45 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

比较例10A

25 比较例10A的步骤与样品皆同于实施例1，但将该纯化管的半透膜置换为Advantec公司的疏水性聚四氟乙烯(品名：Supported PTFE)，膜孔径为0.45 μm；重复实施例1的步骤，但于本发明的装置中进行核酸萃取，所使用的正负气压为60kpa/-60kpa，且收集步骤重复两次。

比较例7B

30 比较例7B的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例7A所使用的半透膜。

比较例8B

比较例8B的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例8A所使用的半透膜。

比较例9B

比较例9B的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例9A所使用的半透膜。

比较例10B

5 比较例10B的步骤及检体均与比较例1相同，重复比较例1的步骤，仅将所使用的纯化管中的半透膜置换为实施例10A所使用的半透膜。

以上比较例7A至10A以及比较例7B至10B的抽取出的gDNA的结果汇整于下表3中。

10

表3

比较例	半透膜材质	萃取 DNA 量(ng)	A260/A280
比较例 7A	疏水性羧化聚偏二氟乙烯	0.9	1.91
比较例 8A	疏水性尼龙	0.1	1.21
比较例 9A	疏水性聚醚砜	0.2	1.38
比较例 10A	疏水性醋酸纤维素	0.2	1.32
比较例 7B	疏水性羧化聚偏二氟乙烯	0.1	2.01
比较例 8B	疏水性尼龙	N.A.	N.A.
比较例 9B	疏水性聚醚砜	0.1	1.28
比较例 10B	疏水性醋酸纤维素	0.2	1.38

由表3中可见，使用疏水性半透膜由于无法与核酸的亲水性基团透过改变周围的极性互相吸引，因此无论是使用本发明的方法及装置，或是使用习知的管柱离心萃取法，均无法有良好的萃取效能。

15

综上所述，本发明克服了技术偏见，不如习知技术中必须由纯化管的上端加入检体，而在对该纯化管提供具有核酸的检体之前，便先将纯化管一端(纯化管上端)与压力设备结合，而使萃取核酸时所须用到的所有液体材料均仅由纯化管的另一端(纯化管下端)进出。如此一来，使用本发明的方法、装置或自动化机台，于萃取核酸中的所有步骤均可简易地利用提供正负压力的方式，由纯化管的同一端吸取/排出液体，不仅可简化萃取步骤，且可使液体反复通过半透膜而达到增进萃取效率的结果，且该自动化机台可不必配置离心机，仅须配置能够提供压力差的装置，而可达到缩小体积的功效。

25

5

权利要求书

1.一种气压式萃取核酸的方法，其特征在于包含：

(a)将一纯化管上端与一施以正或负气体压力的压力设备气密接合，其中该纯化管为具有半透膜的通孔管体；

10 (b)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的下端吸取含有核酸的检体，使该检体通过该半透膜后，该核酸与该半透膜电性或极性结合；

(c)开启该压力设备对该纯化管施以正气压，使残余检体以相反于步骤(b)的方向通过半透膜后，由纯化管的下端流出，且其中该步骤(b)及(c)仅进行一次或重复进行多次；

15 (d)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的下端吸取冲提液，使该冲提液通过半透膜后，改变该半透膜电性或极性使核酸与半透膜分离并溶于冲提液中；及

20 (e)开启该压力设备对该纯化管施以正气压，使该溶有核酸的冲提液相反于步骤(d)的方向通过半透膜后，由该纯化管的下端排出并收集，且其中该步骤(d)及(e)仅进行一次或重复进行多次。

2.如权利要求 1 的方法，其特征在于，步骤(c)及(d)之间进一步包含至少一次的清洗步骤，该清洗步骤包含：

(c-1)开启该压力设备对该纯化管施以负气压，利用该纯化管的下端吸取清洗液，使该清洗液通过该半透膜；及

25 (c-2)开启该压力设备对该纯化管施以正气压，使该清洗液以相反于(c-1)的方向通过半透膜后，由纯化管的下端流出。

3.如权利要求 1 的方法，其特征在于，该纯化管上端与该压力设备中间进一步设有一具滤膜的转接头。

4.如权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其特征在于，该施以正或负气体压力的30 压力设备为一唧筒。

5.如权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其特征在于，该纯化管的下端进一步设有一与其气密接合的移液器吸管。

6.一种气压式萃取核酸的装置，其包含：一针筒，该针筒包含一筒体、设置于该筒体内的一推杆，其特征在于，该筒体内的推杆下方设有一与核酸电性或极性结合的半透膜。

7.一种利用权利要求 1 的方法萃取核酸的气压式萃取核酸的自动化机台，其特征在于包含：

一主机台，具有运作所需的电子零件组；

- 5 一移动装置，与该主机台电性相连；
一唧筒，与该主机台电性相连；
以及一操作台，与该主机台电性相连，且该操作台包含一纯化套组。
8.如权利要求 7 的自动化机台，其特征在于进一步包含一加热模组。
9.如权利要求 7 或 8 的自动化机台，其特征在于该纯化套组包含：
10 (a) 一具有半透膜的纯化管、
 (b) 一具滤膜的转接头、
 (c) 一移液器吸管、
 (d) 一用于容置检体的孔盘、
 (e) 至少一个用于容置缓冲液的孔盘；及
15 (f) 一用于容置萃取后产物的孔盘。
10.如权利要求 9 的自动化机台，其特征在于，该纯化套组一体排列为一行纯化匣的形式。

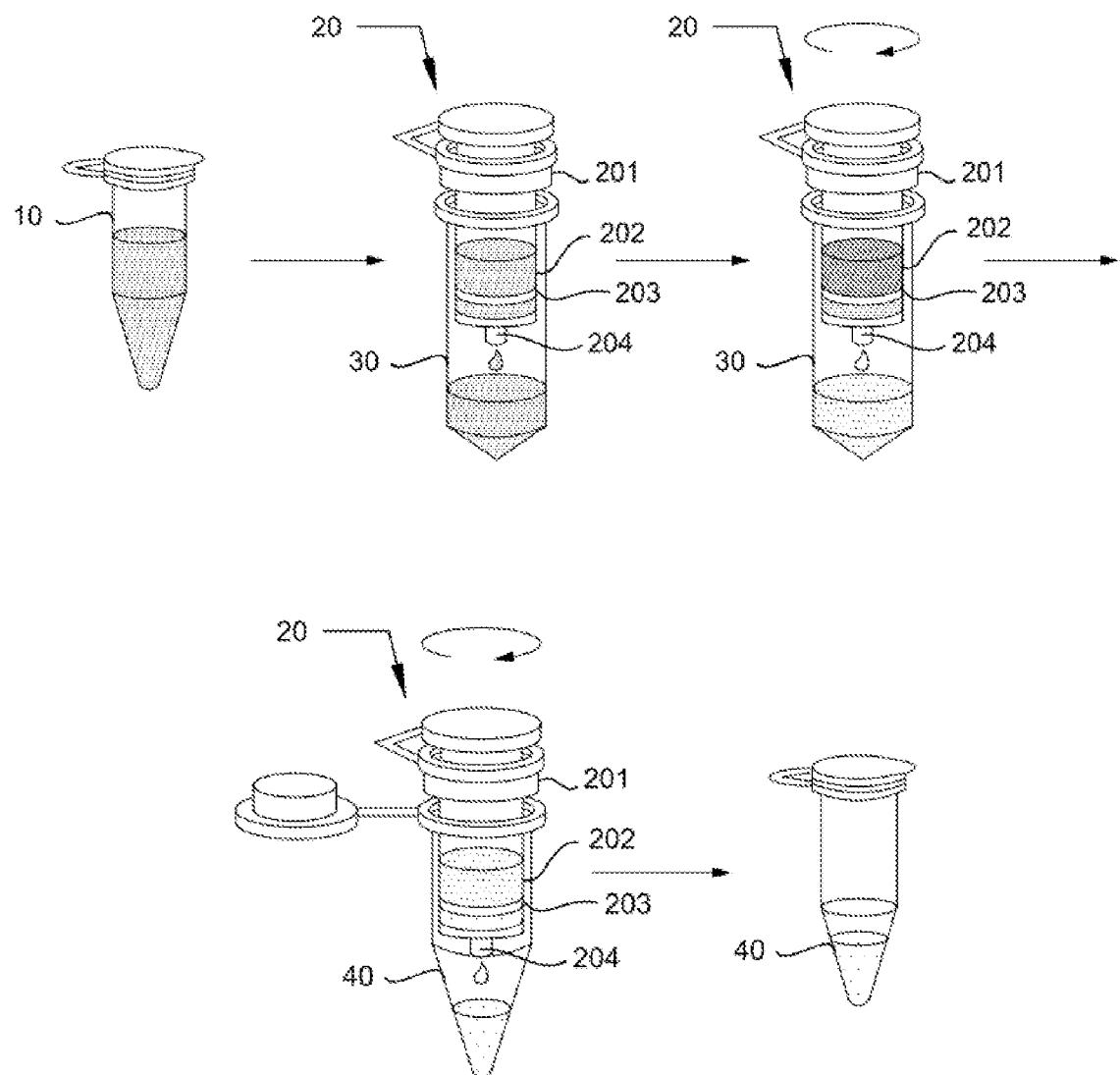


图1

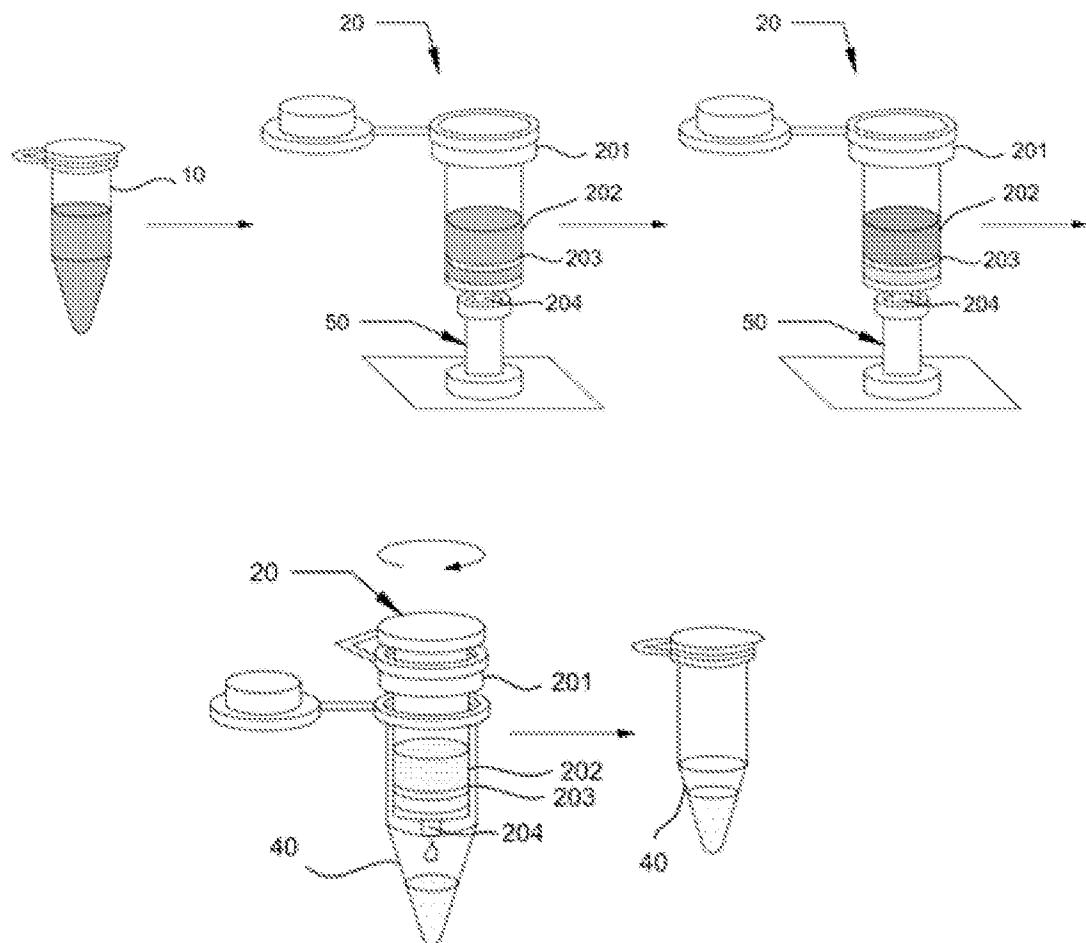


图2

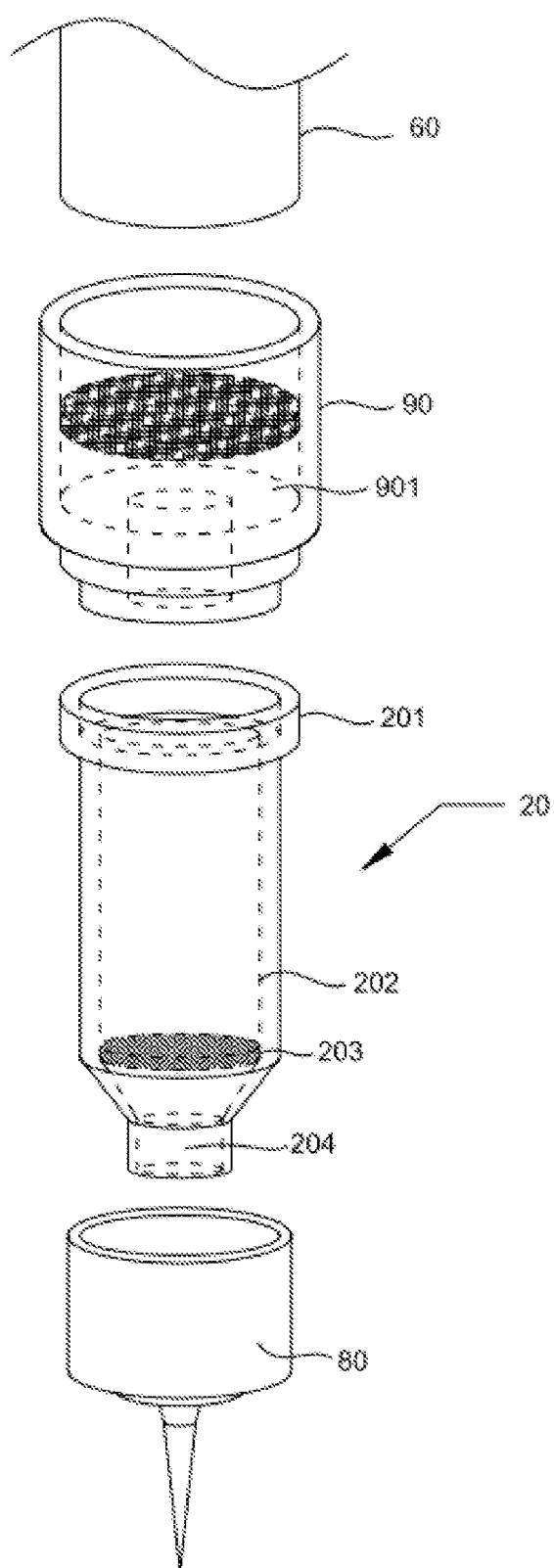


图3

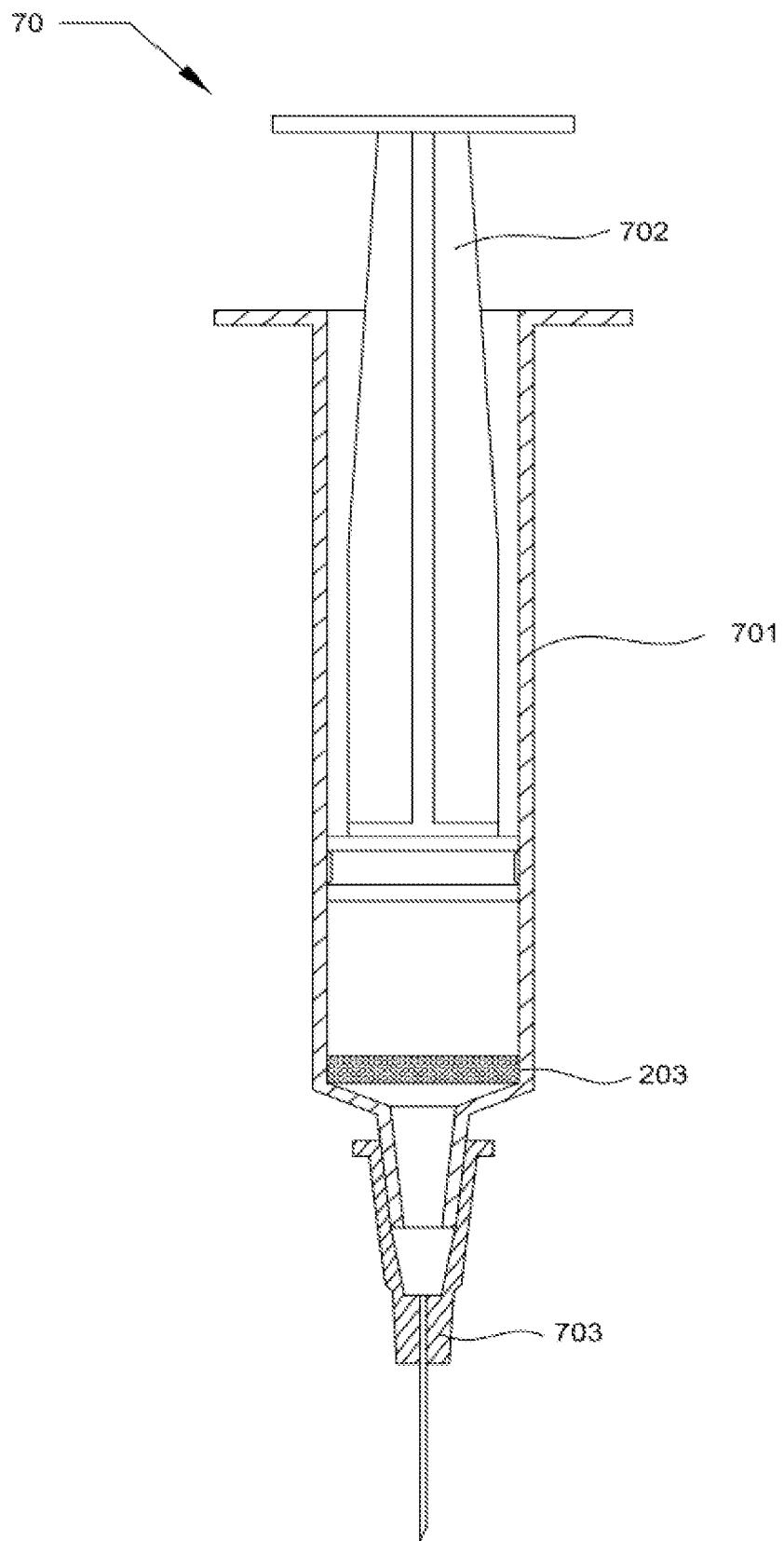


图4

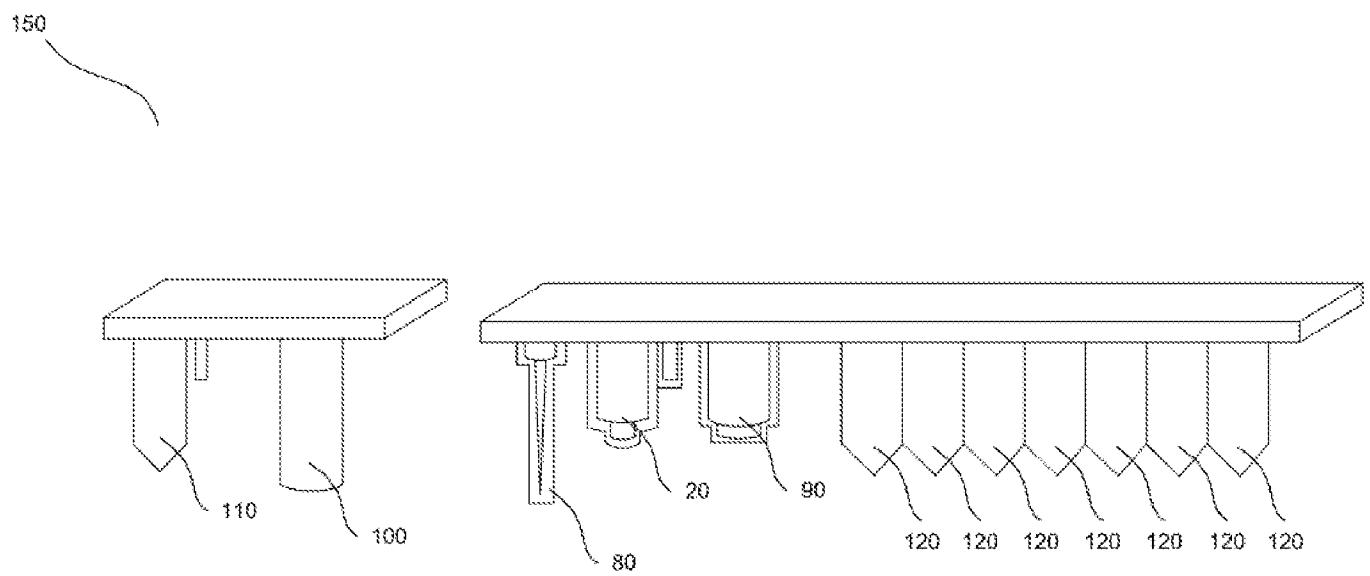


图5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/083610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N 15/-; B01D 35/-; B01D 29/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, extract+, nucleic acid, pressure, membrane, film, tube

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101684463 A (USTAR BIOTECHNOLOGIES (HANGZHOU) LTD.) 31 March 2010 (31.03.2010) claims 1-11, embodiments, and figures 3-5	1-10
X	CN 1749264 A (HITACHI HIGH TECH CORP.) 22 March 2006 (22.03.2006) claims 1-20, embodiments, and figures 1-7	1-10
X	CN 101538567 A (HANGZHOU USTAR BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) 23 September 2009 (23.09.2009) claims 1-14, embodiments, and figure 1	1-10
A	CN 102131913 A (WAKO PURE CHEM IND LTD.) 20 July 2011 (20.07.2011) the whole document	1-10
A	US 2003/0098271 A1 (SOMACK, RALPH et al.) 29 May 2003 (29.05.2003) the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&”document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 November 2013 (21.11.2013)

Date of mailing of the international search report
19 December 2013 (19.12.2013)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
LI, Zidong
Telephone No. (86-10) 62414280

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/083610

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101684463 A	31.03.2010	None	
CN 1749264 A	22.03.2006	EP 1637599 A2 JP 2006083114 A US 2006063180 A1 EP 1637599 A3	22.03.2006 30.03.2006 23.03.2006 28.11.2007
CN 101538567 A	23.09.2009	CN 101538567 B	19.09.2012
CN 102131913 A	20.07.2011	WO 2010024906 A1 EP 2315824 A1 US 2011151577 A1 JP 2012501177 A	04.03.2010 04.05.2011 23.06.2011 19.01.2012
US 2003/0098271 A1	29.05.2003	WO 03046509 A2 AU 2002361619 A1 EP 1448759 A2 JP 2005510705 A AU 2002361619 A8 WO 03046509 A3	05.06.2003 10.06.2003 25.08.2004 21.04.2005 20.10.2005 24.12.2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/083610

Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF SECOND SHEET

C12N 15/10 (2006.01) i

B01D 35/00 (2006.01) i

B01D 29/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N 15/-, B01D 35/-, B01D 29/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, 萃取, 提取, 抽提, 核酸, 气压, 半透膜, 管, 筒, extract+, nucleic acid, pressure, membrane, film, tube

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101684463 A(杭州优思达生物技术有限公司)31.3 月 2010(31.03.2010) 权利要求 1-11, 具体实施方式, 附图 1-3	1-10
X	CN 1749264 A (株式会社日立高新技术) 22.3 月 2006 (22.03.2006) 权利 要求 1-20, 具体实施方式, 附图 1-7	1-10
X	CN 101538567 A(杭州优思达生物技术有限公司)23.9 月 2009(23.09.2009) 权利要求 1-14, 具体实施方式, 附图 1	1-10
A	CN 102131913 A (和光纯药工业株式会社) 20.7 月 2011 (20.07.2011) 全 文	1-10
A	US 2003/0098271 A1 (SOMACK, Ralph 等) 29.5 月 2003 (29.05.2003) 全 文	1-10

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权目的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了

理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的
发明不是新颖的或不具有创造性“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

21.11 月 2013 (21.11.2013)

国际检索报告邮寄日期

19.12 月 2013 (19.12.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

李子东

电话号码: (86-10) 62414280

国际检索报告
关于同族专利的信息

**国际申请号
PCT/CN2013/083610**

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101684463 A	31.03.2010	无	
CN 1749264 A	22.03.2006	EP 1637599 A2	22.03.2006
		JP 2006083114 A	30.03.2006
		US 2006063180 A1	23.03.2006
		EP 1637599 A3	28.11.2007
CN 101538567 A	23.09.2009	CN 101538567 B	19.09.2012
CN 102131913 A	20.07.2011	WO 2010024906 A1	04.03.2010
		EP 2315824 A1	04.05.2011
		US 2011151577 A1	23.06.2011
		JP 2012501177 A	19.01.2012
US 2003/0098271 A1	29.05.2003	WO 03046509 A2	05.06.2003
		AU 2002361619 A1	10.06.2003
		EP 1448759 A2	25.08.2004
		JP 2005510705 A	21.04.2005
		AU 2002361619 A8	20.10.2005
		WO 03046509 A3	24.12.2003

续： 第 2 页： A.主题的分类

C12N 15/10 (2006.01) i

B01D 35/00 (2006.01) i

B01D 29/00 (2006.01) i