

LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

用于提取细菌中质粒 DNA 的装置

相关申请的交叉引用

本公开要求于 2021 年 5 月 10 日提交中国专利局的申请号为“CN 202110506985.5”名称为“用于提取细菌中质粒 DNA 的装置”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开涉及生物医药技术领域，尤其涉及一种用于提取细菌中质粒 DNA 的装置。

背景技术

近年来，由于基因治疗和 DNA 疫苗的临床成功，对工业化规模的质粒发酵生产需求已经非常迫切。

当前规模化质粒的生产技术主要包括以下几道工序：载体构建、细菌发酵、菌体裂解、固液分离及澄清、质粒纯化。虽然目前的质粒生产工艺可以生产出符合药理学质量标准的质粒，能够满足临床要求，但在这些工艺中还存在着一些难以克服的瓶颈。如产量规模化（千克级）较难，载体拷贝数、稳定性问题，裂解过程中导致 DNA 变性、HCD 残留去除，固液分离较难，内毒素残留等难题。

用于生物制药的质粒 DNA 主要在大肠杆菌中生产，碱裂解法是一种应用最为广泛的制备质粒 DNA 的方法。利用碱性条件将细胞裂解，同时染色体 DNA 发生不可逆变性，而质粒 DNA 在 pH 恢复中性时可复性的原理，将质粒与染色体 DNA 分离。质粒复性的第一步也是最关键的一步是细胞裂解，如何将细胞彻底裂解，染色体 DNA 完全共沉淀，去除大部分的 RNA 成为细胞裂解的核心问题。目前工业规模的质粒提取工艺存在的主要问题有：1、碱裂解无自动化设备或设备能力满足不了充分混合的要求；2、使用大量有机溶剂及酸液，这在大规模工业化生产中增加安全风险及对厂房设备要求较高；3、使用中和液（溶液 III）混合后，无自动化的混合设备或混合设备满足不了均匀且低剪切的混合要求；4、中和反应液固液分离生产成本较高；5、宿主 DNA 残留较高；6、RNA 去除率较低，影响下游纯化。7、重复用管路设备清洗困难，不利于 CIP 清洗，而一次性耗材设备成本较高。

中国专利 CN205710712U 公开了一种质粒提取中的裂解装置，包括机架，可转动地设置在机架上的至少一个容纳仓，容纳仓具有放置至少一个装有培养液的瓶体的腔体，用于驱动容纳仓转动的驱动件，以及控制驱动件驱动容纳仓带动瓶体以所需速度、方向和圈数转动的控制器。上述技术方案即为较为传统的加工手段，属于实验室生产，虽然结构较为简洁，但是生产速度较慢，不能进行连续作业。

中国专利 CN111733060A 公开了一种质粒 DNA 碱裂解设备，包括菌液管道；缓冲液管道；菌液悬浮循环装置，包括首尾相连构成回路的循环管道，连接所述的菌液管道和缓冲液管道；所述循环管道上设置有泵和阀门；碱裂解液预配管道；溶胞反应器；中和反应器；酸液管道；收集装置。上述技术装置实现了连续化的裂解，配合相应的过滤装置，可以有效提升生产水平。但是，该技术方案反应装置仍需要通气进行起泡混合，装置结构复杂，管路交错设置，并不利于管路清洗。

中国专利 CN111808716A 公开了一种质粒提取装置，包括裂解容器、沉淀容器、洗脱液容器、收集容器和层析柱，所述裂解容器与沉淀容器之间通过第一连接管连通，所述沉淀容器与层析柱之间通过第二连接管连通，所述洗脱液容器与层析柱之间通过第三连接管连通，所述第一连接管、第二连接管和第三连接管上均设置有阀门，所述收集容器设置在层析柱的下方，所述层析柱连接有振动机构。上述技术方案采取了振动式结构，加工过程不连续，需要进一步提升加工效率，并且该种方式存在宿主 DNA 残留较高的问题，还需要进一步改进。

虽然我们为了解决目前大规模生产质粒 DNA 的方法存在的缺陷，先前研发了一种通过混合腔震荡的方式进行裂解、中和提取细菌中质粒 DNA 的方法（参见：200610114061.6，一种连续大量提取质粒的方法），但是其不容易放大，提取的质粒 DNA 的效率较低；为解决这一问题，我们又研发了一种通过气泡混合器提取质粒 DNA 的装置（参见：202011120617.9，用于提取细菌中质粒 DNA 的气泡发生装置），其使菌液与裂解液能均一且充分混合，气泡混合有效降低剪切力，有效提高收率与质量，但是此装置仍存在不容易放大的问题，需要根据规模定制不同大小的气泡混合器，摸索通气量，流速等放大条件。

因此，我们公开设计了一种新的质粒 DNA 的提取设备和方法，除了能有效控制混合过程的剪切力，更容易实现放大工艺，相比通过气泡混合器（气泡发生装置）的方式，能有效提高裂解及中和过程的混合效率，增加收率；通过易控地调节混合参数，能有效控制剪切力，提高质粒质量。并且该装置原理简单，可精准调控，因此缩短放大条件摸索的时间，进一步提高工作效率，会大大促进连续地、大规模提取质粒 DNA 相关研究的发展，具有重要意义。

发明内容

有鉴于此，本公开提供一种用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，能够解决上述问题。

本公开提供一种用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，包括：第一混合组件和第二混合组件；

所述第一混合组件与所述第二混合组件通过所述裂解螺旋管相连接；所述裂解螺旋管与所述第二混合组件的连接管路上设有至少一个进液口；

重悬菌液流入所述第一混合组件混合后，通过所述裂解螺旋管裂解得到裂解液，再通入

所述第二混合组件与溶液III中和得到中和反应液，所述裂解液通过所述进液口进入所述第二混合组件。

在一些实施方式中，所述第一混合组件和第二混合组件的结构均可分为搅拌式、乳化式、离心式中的一种。

在一些实施方式中，所述第一混合组件结构为搅拌式或乳化式或离心式；所述第二混合组件为离心式结构；优选地，所述第一混合组件和第二混合组件均为混合泵或搅拌器；更优选地，所述第一混合组件和第二混合组件分别为第一混合泵和第二混合泵，所述第一混合泵和第二混合泵的叶轮均优选为半闭式叶轮。通过采用混合泵的形式，使得裂解和中和过程在密闭的环境中，降低污染环境的几率，使用后方便进行 CIP 和 SIP。

在一些实施方式中，所述第一混合泵和第二混合泵的叶轮均可包括后盖板；所述后盖板上均匀分布有多个导流柱，所述导流柱上至少沿叶轮旋转方向的外侧面呈弧面设置；所述导流柱优选为圆柱、圆台或扇形柱中的一种或多种的组合。

在一些实施方式中，所述导流柱的直径为 0.5mm-40mm，优选为 2mm-10mm；所述导流柱优选为圆柱，或所述导流柱的截面积为中间最大，且由中间至两端的截面积逐渐变小。导流柱多个均匀分布，且直径在合适的范围内，能够减小剪切力，防止宿主 DNA 污染产品，使得裂解中和可以自动化进行。

在一些实施方式中，所述导流柱的截面积中间最大，且由中间至两端的截面积逐渐变小，具体实施时，所述导流柱的结构可为纺锤形。

在一些实施方式中，所述裂解螺旋管内径为 0.5cm-15cm，优选为 0.5cm-9cm，所述第一混合泵和第二混合泵的泵头直径均可分为 2cm-100cm，优选为 4cm-30cm；所述第一混合泵和第二混合泵的泵腔体积与单个混合泵额定每分钟进料体积的比值范围均可分为 1:6-1:1，优选的比例为 1:6-1:3；或所述第一混合泵和第二混合泵的泵腔体积均为料液流经泵腔内 10s-60s 的体积，优选为料液流经泵腔内 10s-20s 的体积。

在一些实施方式中，所述导流柱的长度与分布位置关联，各导流柱的长度由所述后盖板的中心处向外缘依次递减，且各导流柱的顶点均位于同一抛物面上。

在一些实施方式中，所述第一混合泵和第二混合泵的进液端均可与出液端同轴设置；所述进液端位于泵壳的中心处，所述出液端位于泵座的中心处。这样流体进入泵腔内需沿后盖板中心至边缘的顺序经过，绕至后方可排出，使其充分接触导流柱，达到均匀混合的目的，提升中和反应质量。

在一些实施方式中，所述装置还包括过滤组件，所述第二混合组件的出液端连接至所述过滤组件的进液端，所述中和反应液通过所述过滤组件过滤。

在一些实施方式中，所述重悬菌液包括溶液 I 和含有质粒 DNA 的菌体，所述重悬菌液通过第一输送泵混合输送至第一混合组件，与通过第二输送泵输送至第一混合组件的溶液 II 混合后通入裂解螺旋管裂解。

在一些实施方式中，所述过滤组件结构为筛网式、深层过滤式、离心过滤式中的一种或多种组合。

在一些实施方式中，所述过滤组件结构为筛网式或深层过滤式结构；过滤孔径为 0.2 μ m-800 μ m，具体可选取 0.2 μ m-200 μ m；过滤材质包括但不限于纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维和硅胶。

在一些实施方式中，过滤材质包括但不限于纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维、硅胶、聚醚砜、尼龙、聚偏氟乙烯的一种或多种组合。

在一些实施方式中，所述过滤组件结构为离心式结构；离心力为 1000g-20000g，离心时间为 2min-60min，温度为 2°C-40°C。

本公开还提供一种通过上述装置用于提取细菌中质粒 DNA 的方法，在两个串联的混合组件中实现质粒生产过程中的裂解和中和，具体包括以下步骤：

步骤 S1：混合；

步骤 S2：裂解；

步骤 S3：中和；

其中，步骤 S1 在第一混合组件中完成，步骤 S2 在裂解螺旋管中完成，步骤 S3 在第二混合组件中完成，第一混合组件、裂解螺旋管和第二混合组件依次串联。

在一些实施方式中，在步骤 S2 中，裂解 2min-10min，优选 5min。

在一些实施方式中，所述第一混合组件的转速为 50rpm-1500rpm，优选为 200rpm-500rpm；所述第二混合组件的转速为 20rpm-1000rpm，优选为 150rpm-500rpm。

在一些实施方式中，所述用于提取细菌中质粒 DNA 的方法具体包括以下步骤：

步骤 S1：用溶液 I 重悬菌体后，得到重悬菌液，再将重悬菌液、溶液 II 导入第一混合组件混合，得到菌体混合液；

步骤 S2：所述菌体混合液从第一混合组件中流出，进入裂解螺旋管进行裂解，裂解后得到裂解液；

步骤 S3：所述裂解液与溶液 III 进入第二混合组件后，进行中和反应（或裂解液与溶液 III 先预混后，再通入第二混合组件），得到中和反应液；

在典型的实施方式中，得到中和反应液后，还包括将其进行固液分离和纯化的步骤。

其中，

步骤 S1 中, 重悬菌液与菌体的体积质量比为 3-20:1 (L: kg), 进一步优选为 7:1 (L: kg)。

步骤 S1 中, 溶液 I 与溶液 II 的体积比为 1:0.5-1:3, 进一步优选为 1:1。通过不同的管路粗细和长度, 控制碱裂解时间为 2min-10min, 保证菌体裂解完全及裂解效果。

步骤 S1 中, 所述溶液 I 包括 Tris-HCl 和 EDTA-2Na, 进一步优选地, 所述 Tris-HCl 浓度为 2mmol/L-100mmol/L, EDTA-2Na 浓度为 0.1mmol/L-50mmol/L, 溶液 I 的 pH 范围为 6.0-9.0。

步骤 S1 中, 所述溶液 II 包括 NaOH 和 SDS, 进一步优选地, 所述 NaOH 浓度为 0.02 mol/L-5 mol/L, SDS 浓度为 0.1%-10%。

步骤 S2 中, 所述裂解的时间为 2min-10min, 进一步优选为 5min。

步骤 S3 中, 所述溶液 III 包括 KAc 和 NH₄Ac, 进一步优选地, 所述 KAc 浓度为 0.1mol/L-6mol/L, NH₄Ac 浓度为 0.2mol/L-10mol/L。

步骤 S3 中, 裂解液与溶液 III 的体积比为 1:0.3-5, 进一步优选为 1:1。通过上述条件来控制裂解、中和效果, 保证宿主 DNA 的沉淀和宿主 RNA 去除效果。

本公开具有如下优点:

本公开明在质粒生产过程中的碱裂解和中和环节, 开拓性地采用混合组件串联的形式, 并结合输送泵使得裂解和中和过程在密闭的环境中, 降低污染环境的几率, 使用后方便进行 CIP 和 SIP, 且实现了连续的加工, 提升了生产效率, 同时也方便生产规模的放大, 相较于目前主流的气泡混合器 Airmix 的生产体系来讲, 比较容易放大, 不需要根据规模定制不同大小的气泡混合器, 缩短了放大条件摸索的时间, 提高了工作效率;

进一步, 本公开的设备简单, 操作方便, 且成本低廉, 不需要专业的定制化、价格高昂的设备, 易于在生产中放大, 生产成本低; 使用的两台混合组件既可以使菌液和裂解液的充分混合又可以保证和中和液温和地混合中和, 避免使用复杂的低剪切中和设备, 裂解时混合充分且混合时间较短, 中和时条件温和均一, 裂解中和后, 宿主 DNA 和 RNA 残留均低于起泡混合器的效果, 产品质量好; 同时优化了泵腔的大小, 使得裂解中和的时间和剪切力适合产品生产, 裂解后的质粒超螺旋比例较高, 宿主 DNA、RNA 残留较少; 此外, 不需要使用复杂的多级的膜过滤系统, 裂解后也不需要过夜沉淀等步骤, 设备可直接用 CIP 清洗, 符合药物生产的生产规范, 同时节省了工艺时间, 降低成本。

进一步, 通过优化泵腔的大小, 结合调整泵腔和流速的比例, 使得裂解中和的时间和剪切力适合产品生产, 同时也方便生产规模的放大; 对混合泵头的性状尺寸进行优化, 使用 3D 打印技术, 对泵头进行设计和定制在保证混合效果的前提下, 降低了剪切力, 防止宿主 DNA 污染产品, 使得裂解中和可以自动化进行。

并且制备过程中不添加高风险的动物来源成分, 如 RNase、溶菌酶、蛋白酶 K 等, 生产

工艺不使用有毒害的有机溶剂如异丙醇、酚、无水乙醇和其他诱变剂等，所用的试剂可以使用一般的试剂或满足药用级别，不使用酸液中和，对厂房设备要求较低，适合大规模生产。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅是本公开的一个或几个实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 为本公开的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置的示意图；

图 2 为本公开实施例 1 中第一混合组件叶轮立体图；

图 3 为本公开实施例 1 中第二混合组件立体图；

图 4 为图 3 中的第二混合组件爆炸图；

图 5 为图 3 中第二混合组件去除泵壳后结构图；

图 6 为图 3 中第二混合组件的叶轮立体图；

图 7 为本公开实施例 1 中产品电泳结果对照图，其中，泳道 1：Marker，泳道 2：离心上清，泳道 3：对照；

图 8 为本公开实施例 2 中第二混合组件叶轮侧视图；

图 9 为本公开实施例 3 中第二混合组件立体图；

图 10 为本公开实施例 3 中第二混合组件立体图；

图 11 为本公开实施例 1、4、5 的电泳结果对照图，其中，泳道 1：实施例 5 的中和反应液上清，泳道 2：实施例 1 的中和反应液上清，泳道 3：实施例 4 的中和反应液上清，泳道 4：标准品，泳道 5：Marker；

图 12 为本公开对比例 1 的电泳结果图，其中，泳道 1：实施例 1 的中和反应液上清，泳道 2：对比例 1 的中和反应液上清，泳道 3：标准品，泳道 4：Marker；

图 13 为本公开对比例 2 中第二混合组件叶轮立体图；

图 14 为本公开对比例 3 中第二混合组件叶轮立体图；

图 15 为本公开实施例 1 与对比例 3 电泳结果对照图，其中，泳道 1：实施例 1 的中和反应液上清，泳道 2：对比例 3 的中和反应液上清，泳道 3：标准品，泳道 4：Marker；

图 16 为本公开实施例 6 中导流柱立体图；其中，图 1-6、9-10 和 16 中：

1-第一混合组件；2-第二混合组件；202-泵座；203-密封圈；204-叶轮；205-泵壳；2021-环形槽；2041-后盖板；2042-导流柱；3-裂解螺旋管；4-过滤组件；5-重悬菌液；6-溶液II；7-溶液III；201-主轴。

具体实施方式

以下将结合实施例和附图对本公开的构思、具体结构及产生的技术效果进行清楚、完整的描述，以充分地理解本公开的目的、方案和效果。需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请实施例中的特征可以相互组合。

还需要说明的是，在本公开的描述中，除非另有明确的规定和限定，术语“设置”、“安装”、“相连”、“连接”等应做广义理解，例如，可以是固定连接，也可以是可拆卸连接，或一体地连接；可以是机械连接，也可以是电连接；可以是直接相连，也可以通过中间媒介间接相连，可以是两个元件内部的连通。对于本领域技术人员而言，可以根据具体情况理解上述术语在本公开中的具体含义。

除非特别指明，本文中的“裂解溶液”均指“溶液II”。

除非特别指明，本文中的“中和液”均指“溶液III”。

下面将结合附图，对本公开做进一步说明。

如图1所示，本公开的用于提取细菌中质粒DNA的装置，包括：第一混合组件1、第二混合组件2和过滤组件4。两混合组件按功能区分，第一混合组件1可为裂解混合组件，第二混合组件2为中和混合组件。

第一混合组件1与第二混合组件2串联连接；两混合组件之间还串接有裂解螺旋管3。具体地，裂解反应所需的溶液I与含质粒DNA的菌体配比后形成重悬菌液5，通过第一输送泵控制流量与流速，向第一混合组件1即裂解混合泵输送。具体实施时，输送管路上还串接有一个第一三通接头（即“Y”形连接器），重悬菌液5与溶液II6可分别通过第一输送泵、第二输送泵送至第一三通接头处，再通入第一混合组件1混合，得到菌体混合液。

第一混合组件1的出液端连接裂解螺旋管3的进液端；裂解螺旋管3的出液端连接第二混合组件2的进液端。其中，裂解螺旋管3与第二混合组件2之间的管路上设有一个进液口，具体为串接管路中的第二三通接头，即“Y”形连接器，第二三通接头的一端还通过第三输送泵连接溶液III7的容器。

优选地，本实施例所用的第一混合组件1和第二混合组件2可为搅拌器或混合泵，具体地可分别为第一混合泵和第二混合泵，包括不限于搅拌泵、乳化泵、离心泵等，其中搅拌泵的搅拌桨可选用桨式搅拌器、推进式搅拌器、涡轮式搅拌器、锚式搅拌器、框式搅拌器、螺旋式搅拌器；乳化泵的转子和定子包括但不限于：粗齿、中齿、细齿。通过一定规则形状的泵头，实现了溶液的充分混合，且剪切力较低，保证染色体DNA不发生大量断裂，且可以在密闭环境下进行，没有污染。进一步由于第一混合组件1用于裂解反应，优选第一混合组件1结构优选为搅拌式或乳化式或离心式其中一种，具体可选取乳化泵，其叶片结构可如图2中所示（还可为现有技术中的其他乳化泵的形式，此处仅以图2示之）；第二混合组件2用

于中和反应，可选取离心式结构，如图 3、4 所示，第二混合组件 2 主要包括主轴 201、泵座 202、密封圈 203、叶轮 204、泵壳 205。流体输送路线如图 3 中箭头所示方向，流体通过泵壳 205 中心处的进液端进入泵内部，经过离心混合后可通过泵壳 205 侧向设置的出液端流出，出液端内部管路与泵内腔相切。其中主轴 201 一端连接外部电机的输出端，另一端通过密封装置穿过泵座 202 的中心处，并与叶轮 204 固定连接，泵座 202 与泵壳 205 接触区域加工有环形槽，用于安装密封圈 203。叶轮 204 优选为半闭式叶轮；但是传统的叶轮存在较大缺点，即剪切力比较大，故本实施例中，叶轮 204 如图 5、6 所示设计，包括后盖板 2041。后盖板 2041 上均匀分布有多个导流柱 2042，共计 32 根，分三层环绕中心处，且导流柱 2042 垂直于后盖板 2041 的表面。进一步，为了更好的降低产生的剪切力，导流柱 2042 的形状可为圆柱、圆台或扇形台的一种或多种组合，优选为圆柱。导流柱 2042 的直径范围为 0.5mm-40mm；经检验，优选直径为 2mm-10mm 时可获得较佳的效果。通过优化设计可以减小剪切力，防止宿主 DNA 污染产品，使得裂解中和可以自动化进行。经过实验可知第二混合组件 2 通过设定一定转速范围，控制不同规模的混合效果及剪切力的大小，结合第一混合组件 1 可实现不同规模的菌液自动裂解、中和，从而实现连续化、大规模生产。

在具体实施中，第一混合组件 1 的结构还可优选地与第二混合组件 1 的结构相同。

具体地，第二混合组件 2 的叶轮转速为 20rpm-1000rpm 时产生较好的混合效果。还可针对第二混合组件 2 改变泵头性状、大小、转速以控制中和效果；第二混合泵的泵头直径为 2cm-100cm，优选为 4cm-30cm，转速控制在 20rpm-1000rpm，优选为 150rpm-500rpm，泵腔体积与该混合泵额定每分钟进料体积的比值范围为 1: 6-1:1，优选为 1:6-1:3；或泵腔体积设计为料液流经泵腔内 10s-60s 的体积，优选为料液流经泵腔内 10s-20s 的体积；保证中和完全且产生较低的剪切力，减少染色体 DNA 的断裂，提高质粒 DNA 的质量。

第二混合组件 2 的出液端连接过滤组件 4 的进液端。

优选地，过滤组件 4 结构为筛网式、深层过滤式、离心过滤式中的一种或多种组合。具体地，本实施例中过滤组件 4 结构为深层过滤式结构；过滤孔径为 0.2 μ m-800 μ m；具体可选过滤孔径在 0.1 μ m-200 μ m 之间。通过深层过滤的方式对中和后上清液进行二次澄清，过滤的材质成分包括不限于纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维、硅胶及其组合产品。深层过滤膜包膜面积在 0.01m²-2m² 之间。

工作过程如下：

步骤 S1：溶液 I、含质粒 DNA 的菌体预混得到重悬菌液，重悬菌液 5 与溶液 II 6 可分别通过第一输送泵送至第一三通接头处，进行管路内的预混合，之后进入第一混合组件 1 进行搅拌混匀，得到菌体混合液；

步骤 S2: 搅拌混匀后的菌体混合液进入裂解螺旋管 3 进行裂解反应, 之后流出, 得到裂解液;

步骤 S3: 流出裂解螺旋管 3 的裂解液与溶液 III 7 预混后, 再通过第二三通接头输送至第二混合组件 2 中 (或流出裂解螺旋管 3 的裂解液, 流过第二输送泵的溶液 III, 均输送至第二三通接头处, 再通入第二混合组件 2 中), 发生中和反应, 得到中和后的中和反应液;

步骤 S4: 中和后的中和反应液流出后进入过滤组件 4 过滤, 进行固液分离和纯化。

其中,

步骤 S1 中, 重悬菌液与菌体的体积质量比为 3-20:1 (v:m), 进一步优选为 7:1 (v:m)。

步骤 S1 中, 溶液 I 与溶液 II 的体积比为 1:0.5-1:3, 进一步优选为 1:1。

步骤 S1 中, 溶液 I 包括 Tris-HCl 和 EDTA-2Na, 进一步优选地, Tris-HCl 浓度为 2mmol/L-100mmol/L, EDTA-2Na 浓度为 0.1mmol/L-50mmol/L, 溶液 I 的 pH 范围为 6.0-9.0。

步骤 S1 中, 溶液 II 包括 NaOH 和 SDS, 进一步优选地, NaOH 浓度为 0.02mol/L-5 mol/L, SDS 浓度为 0.1%-10%。

步骤 S2 中, 裂解的时间为 2min-10min, 进一步优选为 5min。

步骤 S3 中, 溶液 III 包括 KAc 和 NH₄Ac, 进一步优选地, KAc 浓度为 0.1mol/L-6mol/L, NH₄Ac 浓度为 0.2mol/L-10mol/L。

步骤 S3 中, 流出裂解螺旋管 3 的裂解液与溶液 III 的体积比为 1:0.3-5, 进一步优选为 1:1。通过上述条件来控制裂解、中和效果, 保证染色体 DNA 的沉淀和宿主 RNA 去除效果。

步骤 S4 中, 固液分离方式包括但不限于过滤、深层过滤、离心等方式中的一种或多种组合。优选地, 选择过滤时, 过滤的材质包括但不限于纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维和硅胶中的一种或多种, 过滤孔径在 0.2 μ m-800 μ m; 优选地, 选择深层过滤时, 深层过滤的材质包括但不限于纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维和硅胶中的一种或多种, 深层过滤孔径在 0.1 μ m-200 μ m, 深层过滤膜包面积在 0.01m²-2m²; 优选地, 选择离心时, 离心方式包括但不限于选用台式离心机、管式离心机或碟式离心机, 离心力为 1000g-20000g, 离心时间为 2min-60min, 离心温度为 2°C-40°C。

上述实施例中的提取装置均可用于以下实施例, 如有不同具体会示出, 具体从细菌中提取质粒 DNA 的方法可如下所示:

实施例 1: 50L 发酵规模处理实例

实施例 1 的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置, 泵头直径为 10cm, 两个泵的泵头叶轮均如附图 6 所示, 导流柱直径为 5mm。

(1) 将含有质粒 A 的大肠杆菌 (E.coli) 高密度发酵菌液, 分光光度计测定 OD₆₀₀ 为 84.2,

将发酵液 23.3L 离心收获菌体 3684g, 湿重为 15.8%。将 3684g 的细胞重悬于由 25mM Tris-HCl 和 10mM EDTA-2Na 组成的 pH 为 8.0 重悬液 (溶液 I) 中, 得重悬菌液, 重悬后体积为 25.8L (菌体与重悬体积重量体积比为 1:7)。

(2) 将重悬菌液, 以 140ml/min 的速度泵送至裂解混合泵, 同时将由 0.2M NaOH 和 1%SDS 组成的裂解溶液 (溶液 II) 以 140ml/min 的速度泵送至裂解混合泵 (第一混合组件)。调节裂解混合泵转速为 200rpm, 开始裂解混合, 得到菌体混合液。其中, 裂解混合泵的泵腔体积为与单个混合泵额定每分钟进料体积的比值 1:3。

(3) 菌体混合液从裂解混合泵中泵出后, 进入裂解螺旋管 3, 裂解螺旋管 3 内径为 1.9cm, 长度为 5m, 在裂解螺旋管 3 中裂解时间为 5min, 得到裂解液。

(4) 裂解后的裂解液进入中和混合泵 (第二混合组件), 中和混合泵另一端由 1M KAc 和 7M NH₄Ac 组成的溶液 III (预冷 2-8°C) 以 280ml/min 的速度进入, 中和混合泵设置转速 250rpm, 其中, 中和混合泵叶轮上的导流柱的直径为 5mm, 导流柱的形状为圆柱, 中和混合泵的泵头直径为 8.5cm; 其中, 中和混合泵的泵腔体积为与单个混合泵额定每分钟进料体积的比值 1:4。

(5) 中和完成后, 收集中和中和反应液, 进入过滤组件 4, 选取离心式过滤方式, 以离心力 8000g, 离心 20min 收集上清液进行下一步纯化。

结果检测:

重悬菌液测得质粒浓度为 545mg/L (通过 QIAGEN 的质粒小提试剂盒测得), 质粒总量为 14.06g。

中和后得到中和反应液 100L, 离心后得到上清 82L, 以 HPLC 定量法测得质粒浓度为 121.8mg/L (HPLC 机型: Waters 2695; 色谱柱型号: TOSOH, Tskgel DNA-NPR 4.6mm*7.5cm 2.5 μ m, 下述实施例中的 HPLC 测定条件相同)。裂解收率 71%。

电泳图见图 7, 从图 7 可以看出通过本申请的装置和方法裂解后的上清中质粒纯度较高, RNA 及宿主 DNA 较少。

通过 HPLC 试验以及药典方法检测上述方法制得的质粒 DNA, 结果表明质粒为目的质粒, 且纯度较高, 超螺旋比例大于 95%, 开环比例较少。

实施例 2

在实施例 1 的基础上, 本实施例中导流柱 2042 的长度与分布位置关联, 各导流柱 2042 的长度由后盖板 2041 的中心处向外缘依次递减, 且各导流柱 2042 的顶点均位于同一抛物面上, 如图 8 中虚线所示。相应的泵壳 205 的内表面也设计为抛物面型, 与导流柱 2042 相配合。

过滤组件 4 结构为离心式结构, 可选为串接的台式、管式或碟式离心机; 离心力为

1000g-20000g，离心时间为 2min-60min，温度为 2°C-40°C。

实施例 3

在实施例 1 的基础上，本实施例中第二混合组件 2 的进液端与出液端同轴设置，结合图 9、10 所示，进液端设置于泵壳 205 的中心处，而出液端不在设于泵壳 205 的周侧面，为了进一步增加混合效果，避免进出液口相邻较近导致混合不均匀的情况，将出液口设于泵座 202 的中心处，即后盖板 2041 的后方，围绕转轴加工环形槽 2021，并可在槽底或槽的侧面开口作为出液端，这样流体进入泵腔内需沿后盖板 2041 中心至边缘的顺序经过，绕至后方才可通通过环形槽 2021 排出，使其充分接触导流柱 2042，达到均匀混合的目的，提升中和反应质量。

实施例 4

与实施例 1 不同的是，第一混合泵的转速为 400rpm，第二混合泵的转速为 500rpm，裂解螺旋管的直径为 1.9cm；第二混合泵的泵头直径为 10cm。导流柱为圆柱，其直径为 1mm。其余皆相同。

然后将其中和后的中和反应液进行琼脂糖核酸电泳，测试结果如图 11 中所示，发现实施例 4 中裂解上清中宿主 DNA 和 RNA 均高于实施例 1 裂解上清，证明转速偏高时，杂质会较多。

实施例 5

与实施例 1 不同的是，菌体重悬液为 2.5L，第一混合泵的转速为 100rpm，第二混合泵的转速为 50rpm，裂解螺旋管的直径为 1.9cm；第二混合泵的泵头直径为 10cm。导流柱为圆柱，其直径为 1mm。其余皆相同。

然后将中和后得到中和反应液 10L，离心得到上清液共 7.8L，测得上清液质粒浓度为 96mg/L（HPLC 测定），裂解收率 55.0%，电泳测试结果如图 11 中所示，从图 11 可以看出第一混合泵和第二混合泵转速较低时会导致混合和中和不充分，质粒 DNA 收率较实施例 1 低。

实施例 6

与实施例 1 不同的是，本实施例中导流柱 2042 为变截面设计，目的是为了进一步降低剪切了对中和过程的影响，通过流体运动分析，如图 16 中箭头所示，单根导流柱转动中，流体相对主体的流速分布情况；即从中间层向两边减小，原因分析为流体上下两侧分别受到泵壳即泵座的粘滞阻力，速度呈梯度分布，由此为了保持单根导流柱对流体中遗传物质产生的剪切力较为一致，故将其设计为变截面结构。具体地，以实施例 1 中圆柱体为例，单根导流柱的截面从泵壳一侧至泵座一侧依次为先增加后减小，形成“纺锤形”结构，具体参阅图 16。上述设计，虽然导流柱 2042 中心处相对速度较大，冲击较强，但是结合较大曲率半径及受力面积，可以有效减少对质粒的剪切作用，一定程度上提升了质粒产率。

实施例 7

同实施例 1，检测宿主 DNA 残留（HCD）结果为 5.87 μ g/mg（E.coli 残留 DNA 检测试剂盒）。如表 1 所示，通过 HPLC 试验以及药典方法检测质粒 DNA，结果表明质粒为目的质粒，且纯度较高，超螺旋比例为 95.92%，开环比例较少。

表 1 为实施例 5 中样品质粒及纯度检测 HPLC 峰结果表

样品名称	杂质 1, %	开环, %	超螺旋, %	线性, %	杂质 2, %
离心后	ND	1.15	95.92	ND	2.93

备注：“ND”表示未检出。杂质 1 和杂质 2 为质粒的未知状态。

实施例 8

同实施例 4，检测宿主 DNA 残留（HCD）结果为 18.7 μ g/mg（E.coli 残留 DNA 检测试剂盒）。

实施例 9

与实施例 1 不同的是，本实施例中裂解中和后，采用滤袋过滤和深层过滤的方式进行固液分离。目的是提高放大生产过程中的处理量和提高生产效率，同时减少生产上连续式离心机的机械剪切作用，减少杂质产生和目的质粒被破坏。采用过滤面积为 0.5m²，孔径大小分别为 100 μ m 和 200 μ m 聚丙烯材质的滤袋进行初级过滤，之后采用过滤孔径为 0.2-2 μ m，材质为纤维素和无机助滤剂复合材质的深层过滤进行二级过滤。初级过滤后杂质去除率可达 86.2%，过滤前后的浊度分别为 43NTU 和 10.7NTU，且过滤后质粒纯度未发生明显改变。二级过滤后，滤液更加澄清，浊度可降低至 3NTU 以下，可直接进行下游纯化。如表 2 所示，通过 HPLC 检测质粒 DNA，结果表明质粒为目的质粒，且纯度较高，过滤前，超螺旋比例达 96.08%，100 μ m 滤袋过滤后，超螺旋比例 97.6%，200 μ m 滤袋过滤后，超螺旋比例 97.55%。

表 2 为 100 μ m 和 200 μ m 滤袋过滤前后清液中质粒纯度 HPLC 检测结果

样品名称	杂质 1, %	开环, %	超螺旋, %	线性, %	杂质 2, %
过滤前	0.59	0.74	96.08	ND	2.59
100 μ m 过滤后	ND	0.28	97.60	ND	2.12
200 μ m 过滤后	ND	0.34	97.55	ND	2.11

备注：“ND”表示未检出。HPLC 进样前对均会对样品进行离心，取上清液进样。

对比例 1

与实施例 1 不同的是，对比例 1 的中和步骤不使用泵，在气泡混合器中进行，具体步骤如下：

(1) 将含有质粒 A 的大肠杆菌高密度发酵菌液，分光光度计测定 OD₆₀₀ 为 78.9。取该发酵液 23.5L 离心，收获菌体 3603g，湿重为 15.3%。将 3603g 的细胞重悬于由 25mM Tris-HCl

和 10mM EDTA-2Na 构成的 pH 为 8.0 重悬液（溶液 I）中，得重悬菌液，体积为 25.2L（菌体与溶液 I 的质量体积比为 1:7）。

(2) 将重悬菌液与以 140ml/min 的速度泵送至“Y”形连接器的一侧，同时将由 0.2M NaOH 和 1%SDS 构成的裂解溶液（溶液 II）以 140ml/min 的速度泵送至“Y”形连接器的另一侧。将“Y”形连接器接入裂解混合泵（第一混合组件），调节转速为 200rpm，开始裂解混合，得到菌体混合液。其中，溶液 I 与溶液 II 的体积比为 1:1。

(3) 菌体混合液从裂解混合泵中泵出后，进入裂解螺旋管，裂解螺旋管内径为 1.9cm，长度为 5m，在裂解螺旋管中裂解时间为 5min，得到裂解液。

(4) 裂解后的裂解液进入另一“Y”形连接器，连接器另一端由 1M KAc 和 7M NH₄Ac 组成的溶液 III（预冷 2-8°C）以 280ml/min 的速度进入，通过“Y”形连接器进入气泡混合器，气泡混合器设置压缩空气流速为 1.2L/min。裂解液和溶液 III 的体积比为 1:1。

(5) 中和完成后，收集中和反应液，以 8000g 离心力离心 20min，收集到对比上清液，可进行下一步纯化。

通过酶标仪方法检测，结果表明，重悬菌液测得质粒浓度为 570mg/L（质粒小提试剂盒提取计算得出），质粒总量为 14.36g。

中和后得到中和反应液 101L，离心得到上清液共 79.3L，测得对比上清液质粒浓度为 116.3mg/L（HPLC 测定），裂解收率 64.2%。电泳结果如图 12 所示，从图 12 可以看出本对比例中和过程使用气泡发生器的方法得到质粒 DNA 与实施例 1 的方法得到的质粒 DNA 相比，质粒浓度相当，但是其宿主 RNA 较多，说明本申请的制备方法更优，并且更容易放大，操作简单。

对比例 2

与实施例 1 不同的是，对比例 2 中第二混合泵所用离心泵头叶轮如图 13 所示，其余皆相同。

通过酶标仪检测中和后得到中和反应液 80L，离心得到上清液共 66L，测得上清液质粒浓度为 106.6mg/L（HPLC 测定），裂解收率 64.5%。裂解收率低于实施例 1。

对比例 3

与实施例 1 不同的是，对比例 3 中第二混合泵所用离心泵头叶轮如图 14 所示。其余设置均相同。

与实施例 1 结果相比，测试电泳图如图 15 所示，从图中可以看出，该对比例中泵头裂解上清中宿主 DNA 和 RNA 含量均较多，不利于质粒纯化。

基于上述实施例结果可知，本公开的提取装置，最终产品裂解时混合充分且混合时间较

短，中和时条件温和均一，裂解中和后，宿主 DNA 和 RNA 残留均低于起泡混合器的效果，产品质量较好，且速度适中时提取的质粒 DNA 杂质少，收率高。

本公开在质粒生产过程中的碱裂解和中和环节，开拓性地采用混合组件串联的形式，并结合输送泵使得裂解和中和过程在密闭的环境中，降低污染环境的几率，使用后方便进行 CIP 和 SIP，且实现了连续的加工，提升了生产效率，同时也方便生产规模的放大，相较于目前主流的气泡混合器 Airmix 的生产体系来讲，比较容易放大，不需要根据规模定制不同大小的气泡混合器，缩短了放大条件摸索的时间，提高工作效率；设备简单，操作方便，且成本低廉，不需要专业的定制化、价格高昂的设备，易于在生产中放大，生产成本低；使用的两台混合组件既可以使菌液和裂解液的充分混合又可以保证和中和液（溶液III）温和地混合中和，避免使用复杂的低剪切中和设备，裂解时混合充分且混合时间较短，中和时条件温和均一，裂解中和后，宿主 DNA 和 RNA 残留均低于起泡混合器的效果，产品质量好；同时优化了泵腔的大小，使得裂解中和的时间和剪切力适合产品生产，裂解后的质粒超螺旋比例较高，宿主 DNA、RNA 残留较少；此外，不需要使用复杂的多级的膜过滤系统，裂解后也不需要过夜沉淀等步骤，设备可直接用 CIP 清洗，符合药物生产的生产规范，同时节省了工艺时间，降低成本。

进一步，通过优化混合泵腔的大小，结合调整泵腔和流速的比例，使得裂解中和的时间和剪切力适合产品生产，同时也方便生产规模的放大；对混合泵头的性状尺寸进行优化，使用 3D 打印技术，对泵头进行设计和定制在保证混合效果的前提下，降低了剪切力，防止宿主 DNA 污染产品，使得裂解中和可以自动化进行。

并且制备过程中不添加高风险的动物来源成分，如 RNase、溶菌酶、蛋白酶 K 等，生产工艺不使用有毒害的有机溶剂如异丙醇、酚、无水乙醇和其他诱变剂等，所用的试剂可以使用一般的试剂或满足药用级别，不使用酸液中和，对厂房设备要求较低，适合大规模生产。

以上具体实施方式仅用以说明本公开的技术方案而非限制，尽管参照实例对本公开进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对公开的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本公开技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本公开的权利要求范围当中。

权利要求书

1. 用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，包括第一混合组件和第二混合组件；所述第一混合组件与所述第二混合组件通过裂解螺旋管相连接；所述裂解螺旋管与所述第二混合组件的连接管路上设有至少一个进液口；重悬菌液流入所述第一混合组件混合后，通过所述裂解螺旋管裂解得到裂解液，再通入所述第二混合组件与溶液 III 中和得到中和反应液，所述裂解液通过所述进液口进入所述第二混合组件。

2. 根据权利要求 1 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述第一混合组件和第二混合组件的结构均为搅拌式、乳化式、离心式中的一种，优选地，所述第一混合组件和第二混合组件均为混合泵或搅拌器，所述第一混合组件和第二混合组件可分别优选为第一混合泵和第二混合泵。

3. 根据权利要求 2 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述第一混合泵和第二混合泵的叶轮均包括后盖板；所述后盖板上均匀分布有多个导流柱；所述导流柱上至少沿叶轮旋转方向的外侧面呈弧面设置。

4. 根据权利要求 3 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述导流柱为圆柱、圆台或扇形柱中一种或多种的组合。

5. 根据权利要求 3 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述导流柱的横截面宽度最大值为 0.5mm-40mm，优选为 2mm-10mm；所述导流柱优选为圆柱，或所述导流柱的截面积为中间最大，且导流柱的截面积由中间至两端逐渐变小。

6. 根据权利要求 3 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述裂解螺旋管内径为 0.5cm-15cm，优选为 0.5cm-9cm；所述第一混合泵和第二混合泵的泵头直径均为 2cm-100cm，优选为 4cm-30cm；所述第一混合泵和第二混合泵的泵腔体积与单个混合泵额定每分钟进料体积的比值范围均为 1:6-1:1，优选的比例为 1:6-1:3；或所述第一混合泵和第二混合泵的泵腔体积设计均为料液流经泵腔内 10s-60s 的体积，优选为料液流经泵腔内 10s-20s 的体积。

7. 根据权利要求 3 中所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述第一混合泵和第二混合泵的进液端均与出液端同轴设置；所述进液端位于泵壳的中心处，所述出液端位于泵座的中心处。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述装置还包括过滤组件，所述第二混合组件的出液端连接至所述过滤组件的进液端，所述中和反应液通过所述过滤组件过滤。

9. 根据权利要求 8 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述重悬菌液包括溶液 I 和含有质粒 DNA 的菌体，所述重悬菌液通过第一输送泵混合输送至第一混合

组件，与通过第二输送泵输送至第一混合组件的溶液 II 混合后通入裂解螺旋管裂解。

10. 根据权利要求 8 所述的用于提取细菌中质粒 DNA 的装置，其特征在于，所述过滤组件结构为筛网式、深层过滤式、离心过滤式中的一种或多种组合；优选地，所述过滤组件结构为筛网式或深层过滤式结构；过滤孔径为 0.2 μ m-800 μ m；过滤材质为纤维素、硅藻土、活性炭、聚丙烯纤维或硅胶。

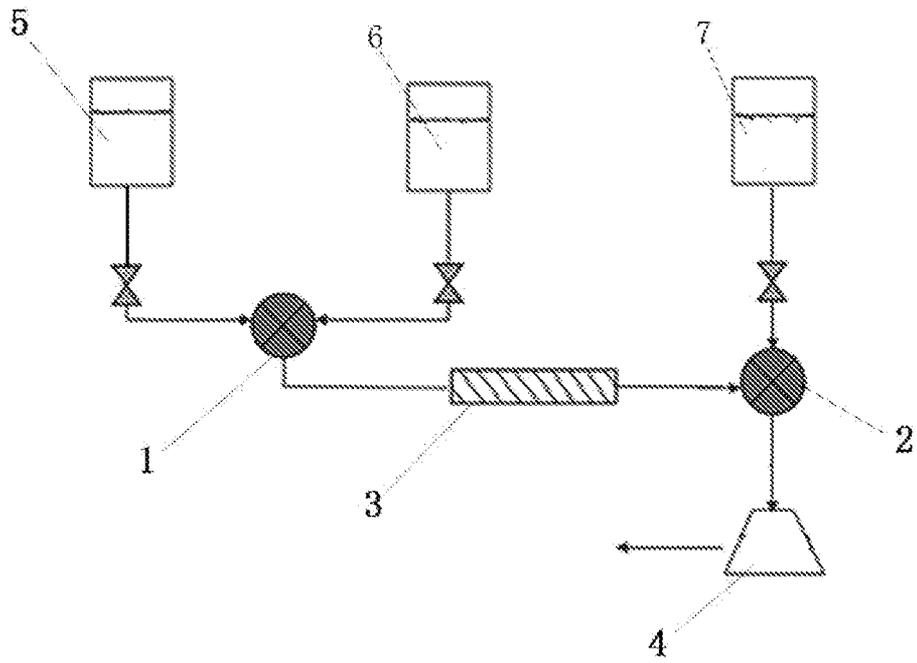


图 1

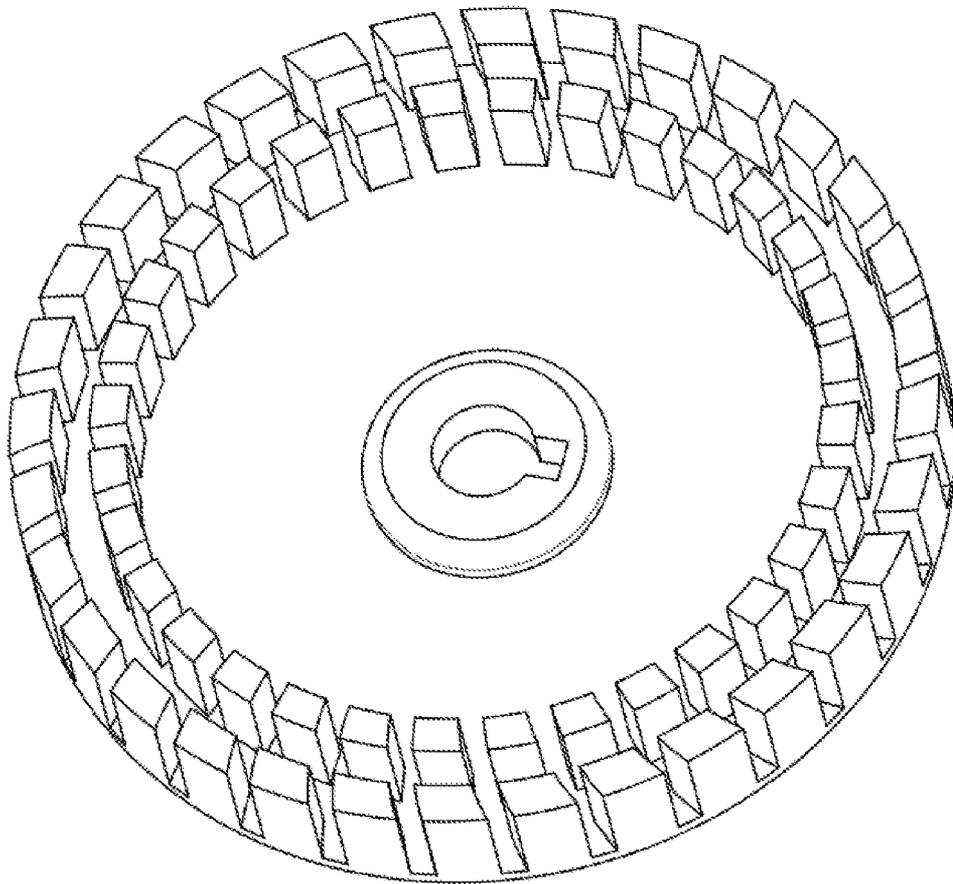


图 2

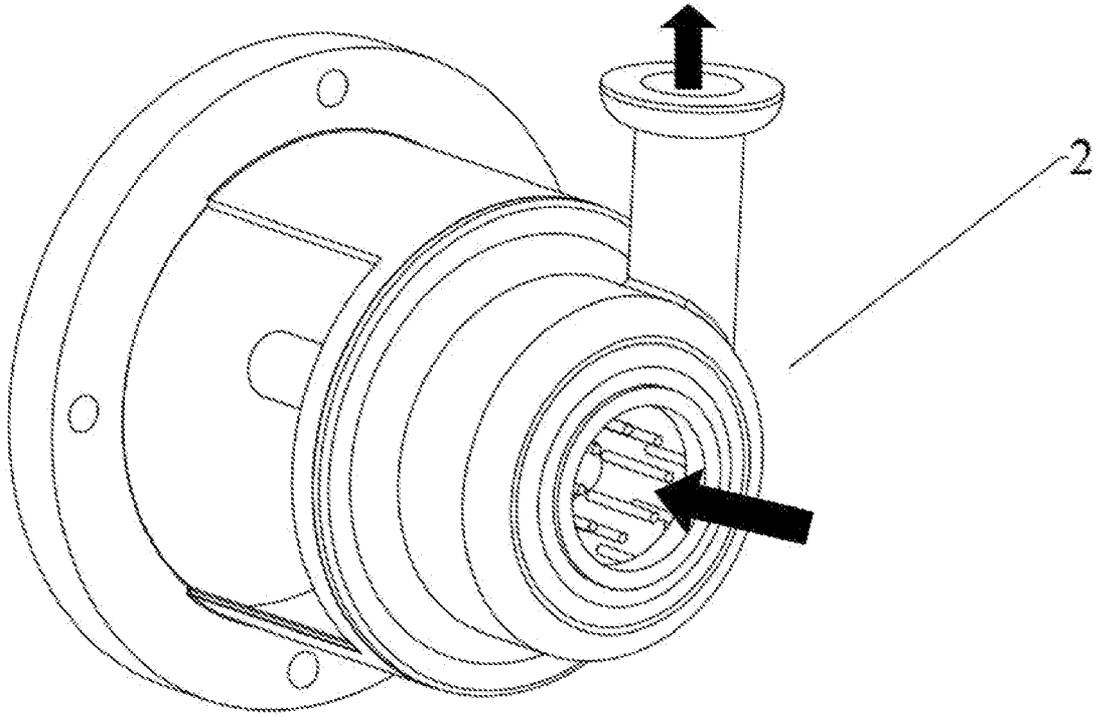


图 3

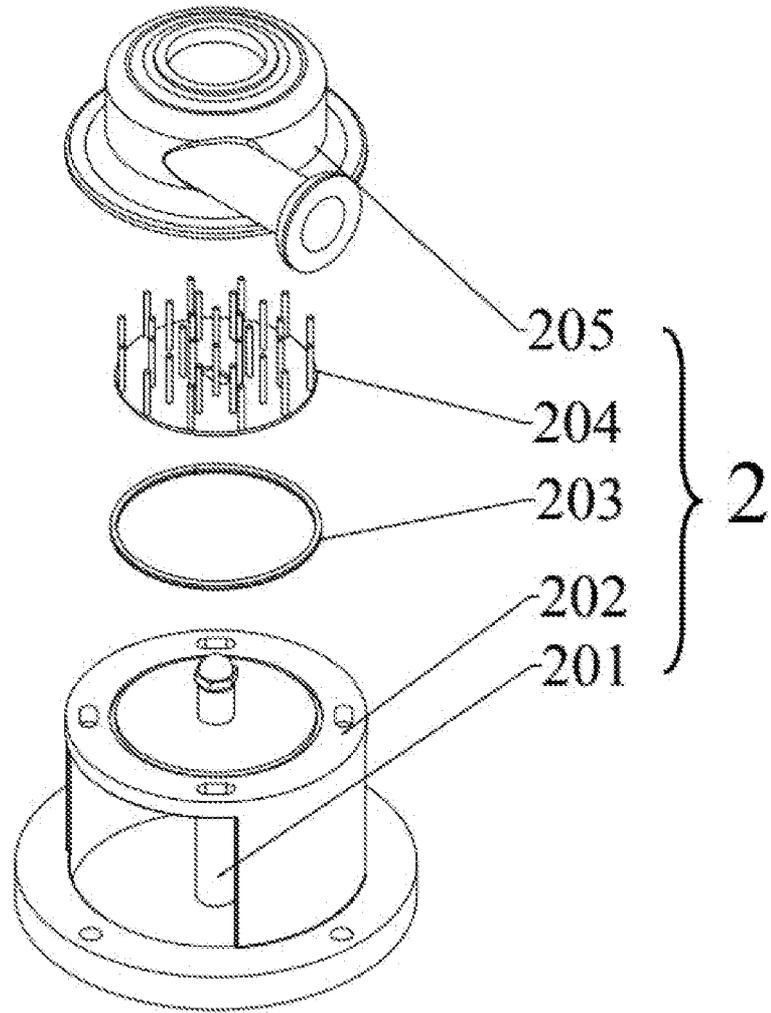


图 4

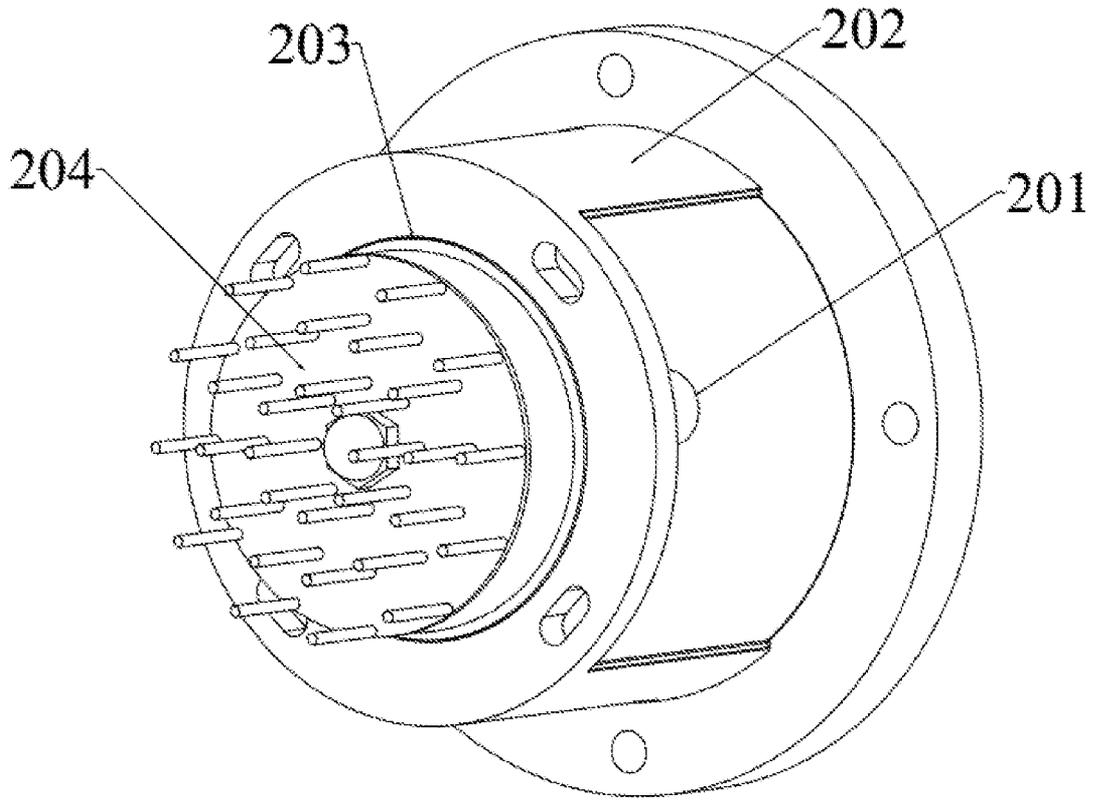


图 5

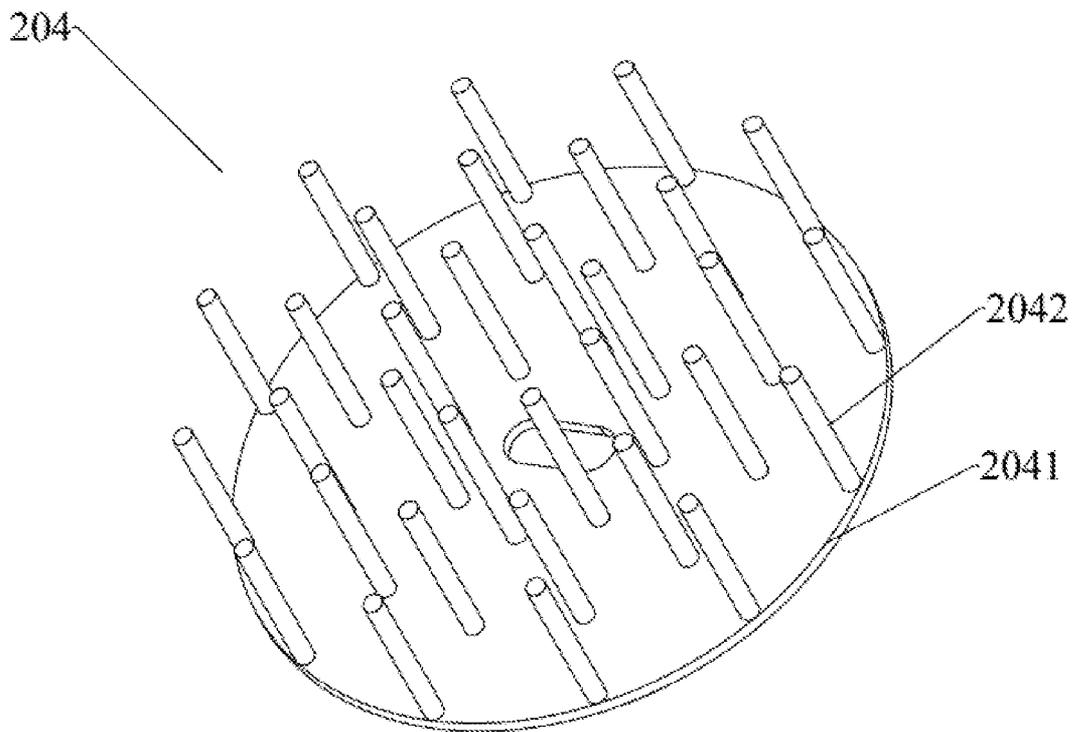


图 6

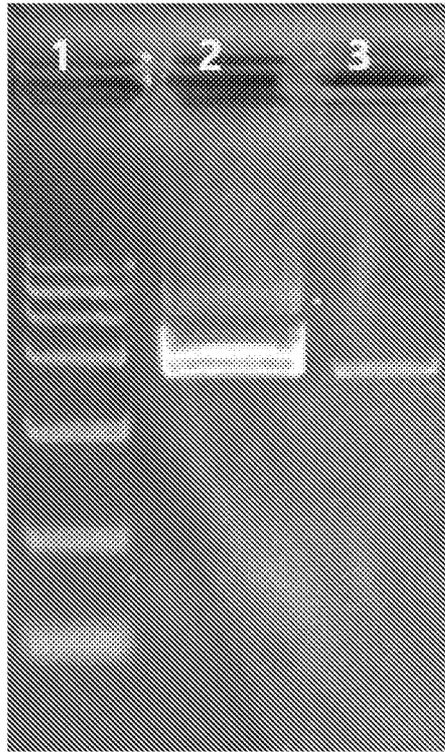


图 7

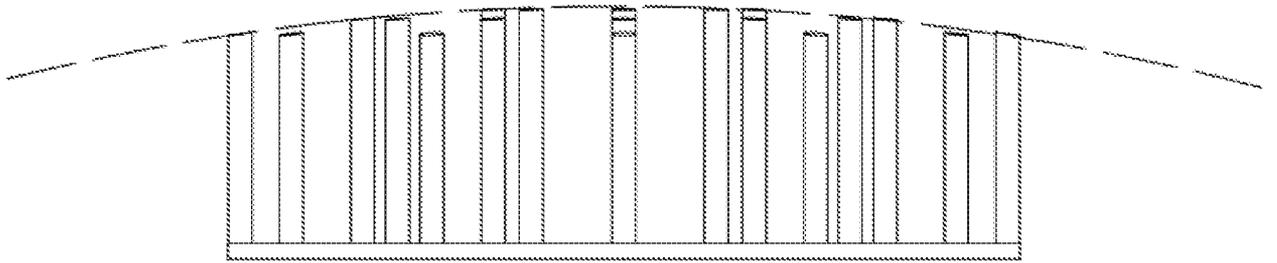


图 8

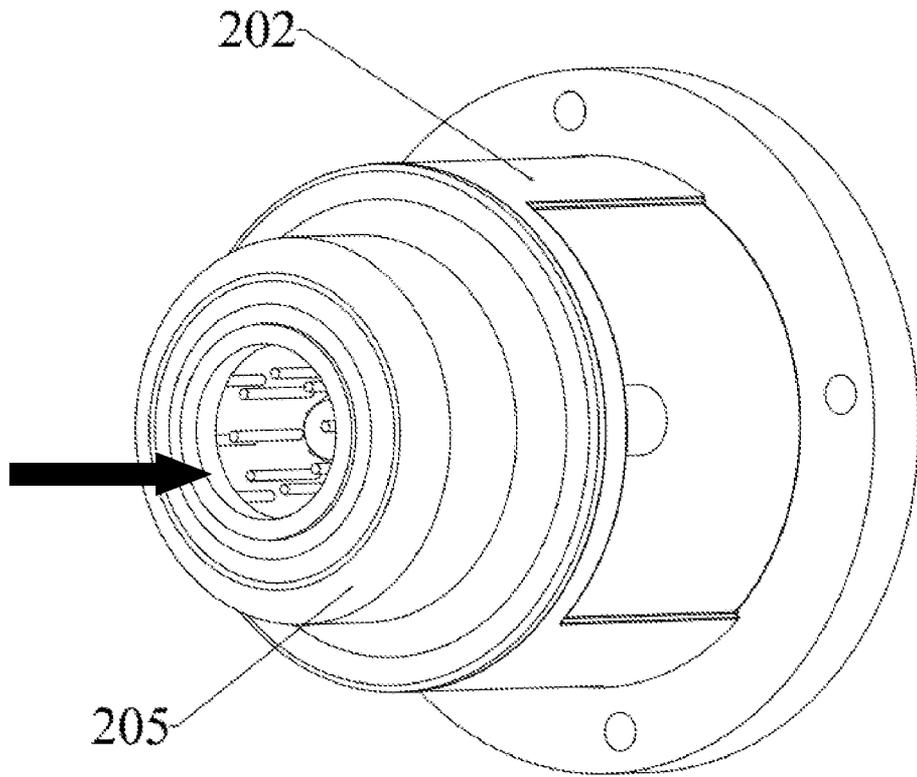


图 9

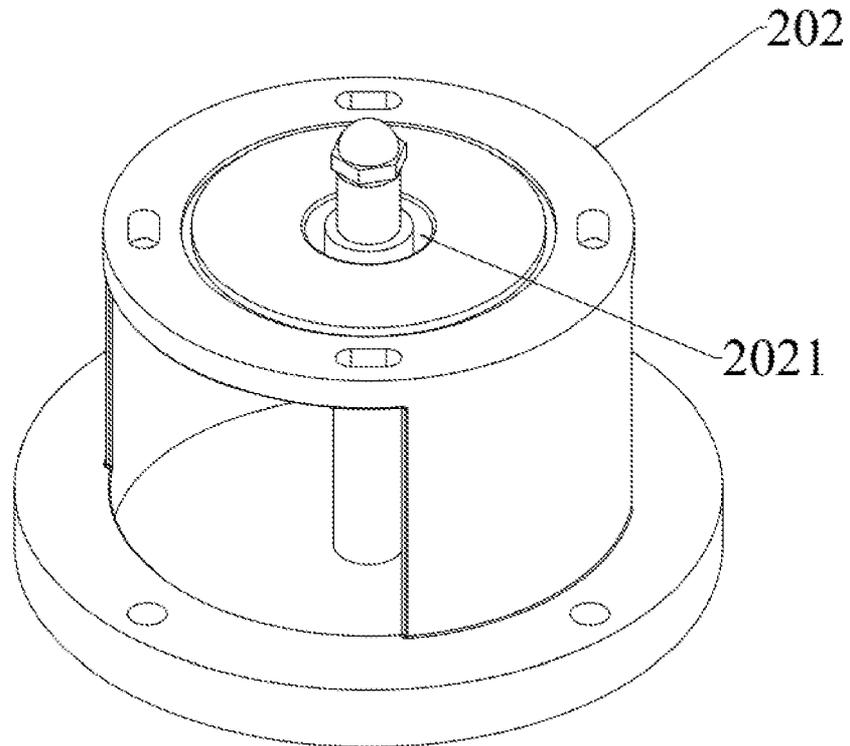


图 10

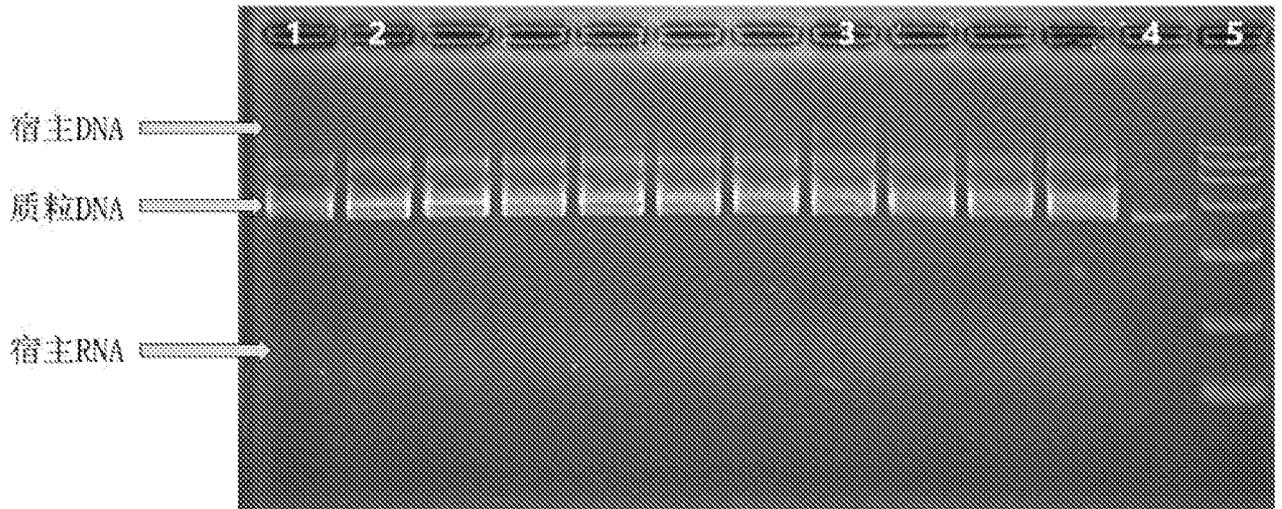


图 11

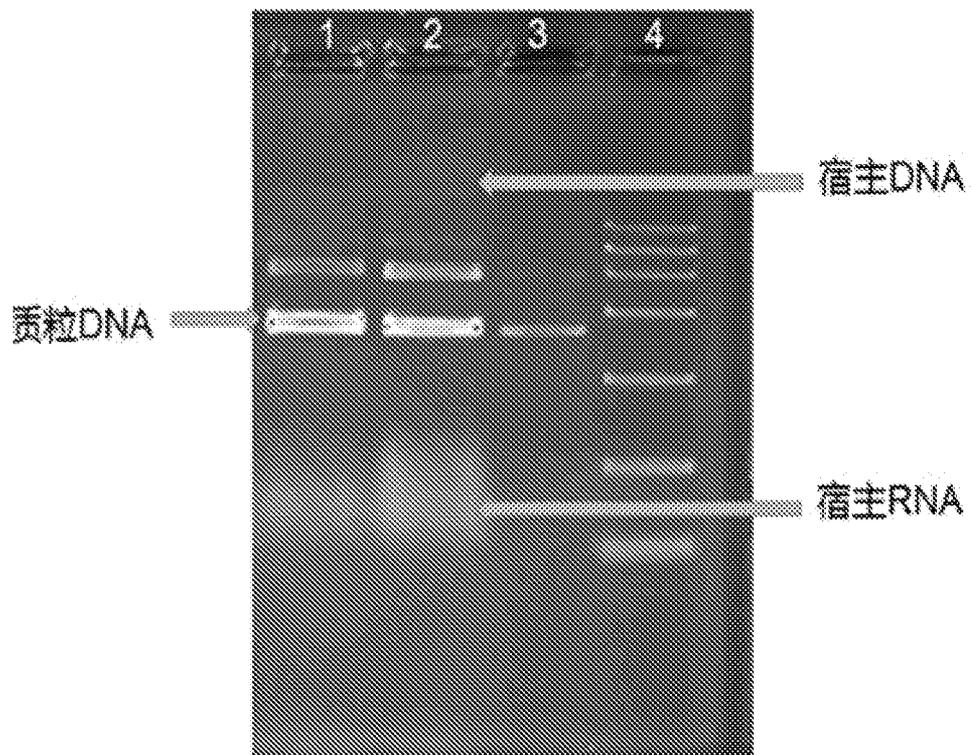


图 12

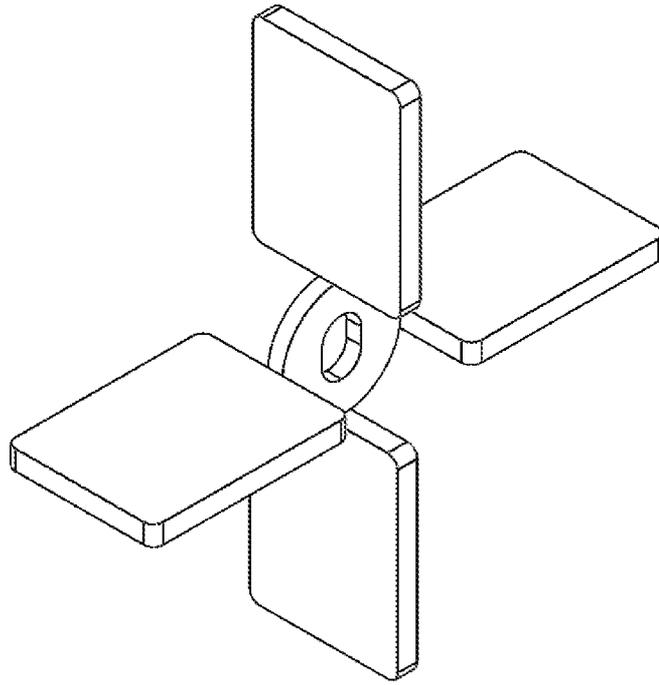


图 13



图 14

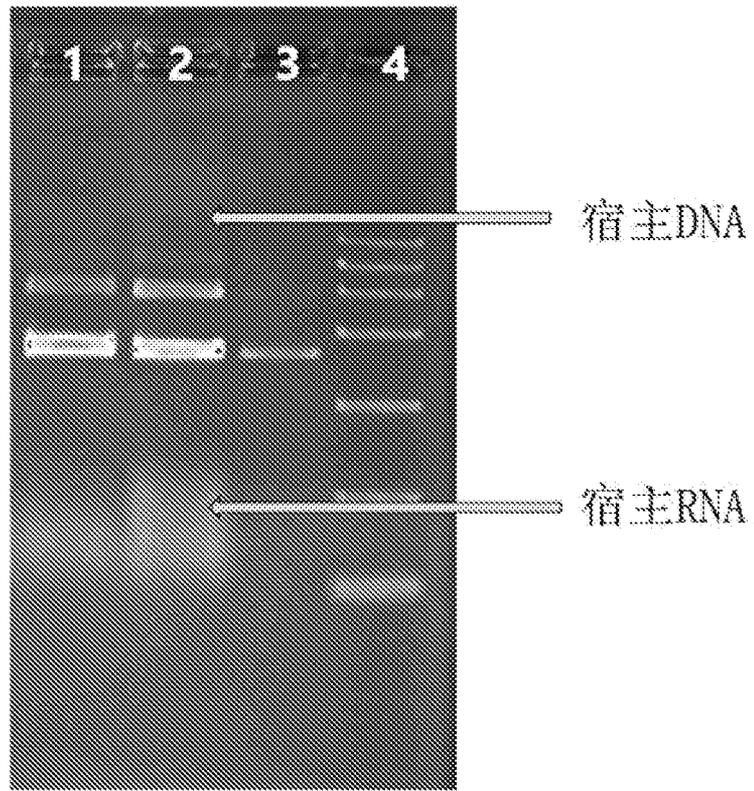


图 15

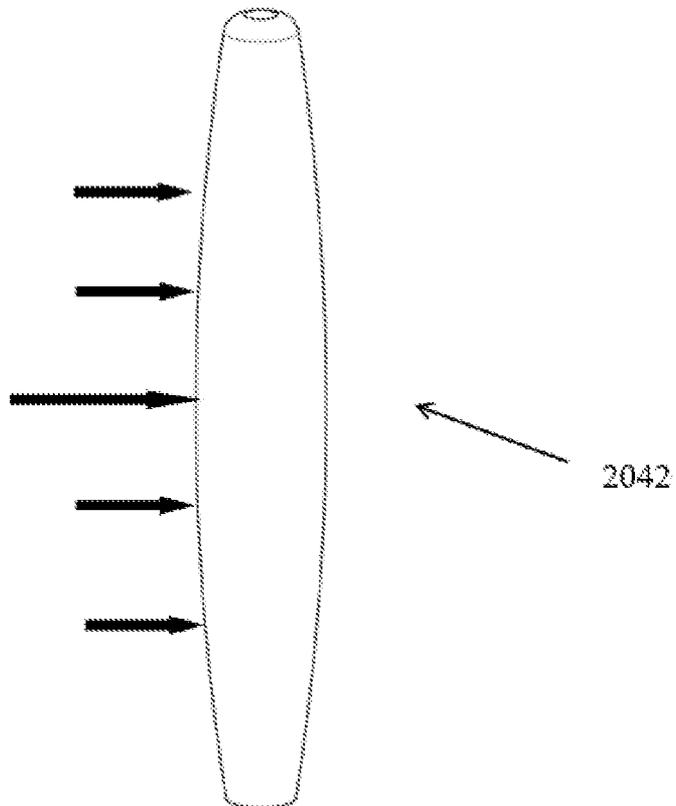


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/082709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12M 1/33(2006.01)i; C12M 1/02(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i		
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)		
C12M		
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)		
CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; 细菌, 裂解, 质粒DNA, 中和, 过滤, 混合, 搅拌, 泵等; DWPI; WPABS; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE: germ?, bacterium, bacteria, crack+, split+, degrad+, plasmid DNA, counteract+, neutraliz+, neutralis+, fiter+, filtr+, mix+, stir+, pump?等		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111979109 A (SHENZHEN PREGENE BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 November 2020 (2020-11-24) see description, paragraphs [0033]-[0055], and figures 1-2	1-10
A	CN 1523033 A (YU MINGWEI) 25 August 2004 (2004-08-25) see description, specific embodiments	1-10
A	CN 101006170 A (CENTELION) 25 July 2007 (2007-07-25) see description, specific embodiments	1-10
A	CN 102242115 A (HENAN HUIER NANO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 16 November 2011 (2011-11-16) see description, specific embodiments	1-10
A	CN 1958800 A (INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH, GUANGDONG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 09 May 2007 (2007-05-09) see description, specific embodiments	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
06 May 2022		09 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/082709

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	111979109	A	24 November 2020	None	
CN	1523033	A	25 August 2004	None	
CN	101006170	A	25 July 2007	DE 602005026113	D1 10 March 2011
				WO 2005100542	A1 27 October 2005
				DK 1737945	T3 09 May 2011
				US 2007213289	A1 13 September 2007
				CN 102031258	A 27 April 2011
				EA 200601728	A1 27 April 2007
				CA 2559368	A1 27 October 2005
				JP 2011132249	A 07 July 2011
				ZA 200607622	B 28 May 2008
				NO 20065290	L 17 November 2006
				JP 2007532123	A 15 November 2007
				AU 2011200978	A1 07 April 2011
				AT 496990	T 15 February 2011
				MX PA06011568	A 20 December 2006
				BR PI0509490	A 11 September 2007
				KR 20060135062	A 28 December 2006
				NZ 549835	A 24 December 2008
				AU 2005233309	A1 27 October 2005
CN	102242115	A	16 November 2011	None	
CN	1958800	A	09 May 2007	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/082709

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12M 1/33(2006.01)i; C12M 1/02(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12M</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS; WPABSC; CNTXT; CNKI; 百度学术和检索词: 细菌, 裂解, 质粒DNA, 中和, 过滤, 混合, 搅拌, 泵等; DWPI; WPA-BS; ENTXT; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE和检索词: germ?, bacterium, bacteria, crack+, split+, degrad+, plasmid DNA, counteract+, neutraliz+, neutralis+, fiter+, filtr+, mix+, stir+, pump?等</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 111979109 A (深圳普瑞金生物药业有限公司) 2020年11月24日 (2020 - 11 - 24) 参见说明书第[0033]-[0055]段, 图1-2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1523033 A (余伟明) 2004年8月25日 (2004 - 08 - 25) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101006170 A (森特利昂公司) 2007年7月25日 (2007 - 07 - 25) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102242115 A (河南惠尔纳米科技有限公司) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1958800 A (广东省农业科学院兽医研究所) 2007年5月9日 (2007 - 05 - 09) 参见说明书具体实施方式</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 111979109 A (深圳普瑞金生物药业有限公司) 2020年11月24日 (2020 - 11 - 24) 参见说明书第[0033]-[0055]段, 图1-2	1-10	A	CN 1523033 A (余伟明) 2004年8月25日 (2004 - 08 - 25) 参见说明书具体实施方式	1-10	A	CN 101006170 A (森特利昂公司) 2007年7月25日 (2007 - 07 - 25) 参见说明书具体实施方式	1-10	A	CN 102242115 A (河南惠尔纳米科技有限公司) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 参见说明书具体实施方式	1-10	A	CN 1958800 A (广东省农业科学院兽医研究所) 2007年5月9日 (2007 - 05 - 09) 参见说明书具体实施方式	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 111979109 A (深圳普瑞金生物药业有限公司) 2020年11月24日 (2020 - 11 - 24) 参见说明书第[0033]-[0055]段, 图1-2	1-10																		
A	CN 1523033 A (余伟明) 2004年8月25日 (2004 - 08 - 25) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
A	CN 101006170 A (森特利昂公司) 2007年7月25日 (2007 - 07 - 25) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
A	CN 102242115 A (河南惠尔纳米科技有限公司) 2011年11月16日 (2011 - 11 - 16) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
A	CN 1958800 A (广东省农业科学院兽医研究所) 2007年5月9日 (2007 - 05 - 09) 参见说明书具体实施方式	1-10																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年5月6日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年6月9日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>穆飞航</p> <p>电话号码 (86-10) 62412295</p>																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/082709

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111979109	A	2020年11月24日	无			
CN	1523033	A	2004年8月25日	无			
CN	101006170	A	2007年7月25日	DE	602005026113	D1	2011年3月10日
				WO	2005100542	A1	2005年10月27日
				DK	1737945	T3	2011年5月9日
				US	2007213289	A1	2007年9月13日
				CN	102031258	A	2011年4月27日
				EA	200601728	A1	2007年4月27日
				CA	2559368	A1	2005年10月27日
				JP	2011132249	A	2011年7月7日
				ZA	200607622	B	2008年5月28日
				NO	20065290	L	2006年11月17日
				JP	2007532123	A	2007年11月15日
				AU	2011200978	A1	2011年4月7日
				AT	496990	T	2011年2月15日
				MX	PA06011568	A	2006年12月20日
				BR	PI0509490	A	2007年9月11日
				KR	20060135062	A	2006年12月28日
				NZ	549835	A	2008年12月24日
				AU	2005233309	A1	2005年10月27日
CN	102242115	A	2011年11月16日	无			
CN	1958800	A	2007年5月9日	无			