



I290583

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94138K20

※申請日期：94.11.2

※IPC 分類：C12N15/10

### 一、發明名稱：(中文/英文)

以使用雷射及珠子之相分離純化核酸之裝置與方法/

APPARATUS AND METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC  
ACIDS BY PHASE SEPARATION USING LASER AND BEADS

### 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

三星電子股份有限公司/

SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

尹鍾龍 / YUN, JONG-YONG

住居所或營業所地址：(中文/英文)

大韓民國京畿道水原市靈通區梅灘洞四一六番地/

416, Maetan-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, Korea

國 籍：(中文/英文) 大韓民國 / KOR

### 三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 李廷健 / LEE, JEONG-GUN

2. 權映男 / KWON, YOUNG-NAM

3. 金玲雅 / KIM, YOUNG-A

國 籍：(中文/英文)

1. 大韓民國 / KOR

2. 大韓民國 / KOR

3. 大韓民國 / KOR

#### 四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 大韓民國/KOR； 2004/11/03； 10-2004-0088907

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明有關一種使用雷射及珠子而藉由相分離以純化核酸之裝置及方法。

### 【先前技術】

對於許多應用而言，自細胞有效萃取 DNA 是需要的，且對於分子診斷(molecular diagnosis)而言是必須的，特別是對於嗜菌體鍵定及定量更為必須。分子診斷一般是在 DNA 萃取步驟之後藉由 DNA 放大而進行。DNA 放大反應包括聚合酶連鎖反應(PCR)、連接酶連鎖反應(ligase chain reaction)、股置換放大(stranded-displacement amplification)、核酸序列放大(nucleic acid-based amplification)、修復連鎖反應(repair chain reaction)、解螺旋酶連鎖反應(helicase chain reaction)、QB 複製酶放大(QB replicase amplification)、接合活化轉錄(ligation activated transcription)。

自細胞分離 DNA 的方法是使用對 DNA 有結合傾向的材料。這些供 DNA 分離用的材料之實例包括矽氧(silica)、玻璃纖維、陰離子交換樹脂、及磁珠(參閱 Rudi, K. 等人所著之 *Biotechniques* 22, 506-511 (1997)；及 Deggerdal, A. 等人所著之 *Biotechniques* 22, 554-557 (1997))。為了避免人工步驟及移除操作者錯誤，有數種自動儀器發展以供高產出之 DNA 萃取。

習知上，細胞裂解係利用機械、化學、熱力、電力、超音波、或微波方法進行(Michael T. Taylor 等人所著之 *Anal.Chem.*, 73, 492-496 (2001))。

雷射用於細胞破裂具有許多優點，且易應用於實驗室晶片(Lab-On-a-Chip, LOC) (Huaina Li 等人所著之 *Anal Chem*, 73, 4625-4631 (2001))。

美國專利申請案公開第 2003/96429A1 號揭示一種雷射引發之細胞裂解系統。當僅使用雷射時，不能產生有效率的細胞裂解。使用大腸桿菌(*E. coli*)置於極澄清的溶液中進行實驗的結果，確認當僅照射雷射時，會獲得很低的細胞裂解效率。於照射雷射 150 秒後測得的 DNA 濃度為 3.77 ng/ $\mu$ l，此乃因為雷射能量未能有效傳輸至細胞之故。藉由習知之加熱法將細胞於 95 °C 煮沸 5 分鐘後，測得的 DNA 濃度為 6.15 ng/ $\mu$ l。

美國專利第 6,685,730 號揭示一種吸光奈米顆粒以增進組織修復。此專利包括一種接合組織之方法，包括：將具有 1 至 1000 奈米尺寸之奈米顆粒遞送至要被接合的組織，此等奈米顆粒可吸收一或多種波長之光；及將此等奈米顆粒曝露至可被奈米顆粒吸收之一或多種波長之光。此法使用雷射及奈米顆粒，僅導致細胞之功能喪失，並未曾有藉由振動含有細胞與顆粒之

溶液以破裂細胞之方法的敘述。

習知一種使用固相純化核酸之方法。例如，美國專利第 5,234,809 號揭示一種使用核酸結合固相(nucleic acid binding solid phase)之純化核酸的方法。詳言之，此方法包括將起始材料、離液材料(chaotropic material)、及核酸結合固相混合，將有核酸結合的固相與液體分離，及洗滌固相核酸複合物。

然而，此方法既費時又複雜，因此不適用於 LOC。此方法亦具有使用離液材料的問題。即，當不使用離液材料時，核酸就不會結合至固相。離液材料對人類有害，因此必須小心處理。而且，離液材料會干擾後續步驟，因此應在純化期間或之後自經純化的核酸移除。

為了能實施 LOC，應減少 DNA 分離的全部步驟，並且需要在細胞裂解後直接進行 PCR。為了在細胞裂解後直接進行 PCR，細胞裂解後所得 PCR 抑制劑濃度應減少。因此，需要一種為了實施 LOC 之目的在進行細胞裂解時移除 PCR 抑制劑之方法。

因此，本發明之發明人致力研究一種方法，以克服上述問題，並發現：當使用微磁珠及雷射振動含有細胞或病毒之溶液以將細胞或病毒破裂、所得之 PCR 抑制劑附接至磁珠、及然後

以附接至毛細管狀容器壁的磁鐵移除附接有 PCR 抑制劑的磁珠時，能夠有效純化核酸。

### 【發明內容】

本發明提供一種使用雷射與珠子藉由相分離以有效純化核酸的裝置及方法。

依據本發明之一方面，提供一種細胞或病毒之核酸純化裝置，包括：一細胞裂解毛細管，其具有一入口，以經由此入口導入樣品及磁珠以進行相分離；一振動器，附接於細胞裂解毛細管，用以將細胞裂解毛細管內之樣品與磁珠混合；一雷射產生器，附接於細胞裂解毛細管，以提供雷射至細胞裂解毛細管；及一磁力產生器，附接於細胞裂解毛細管，以將磁珠固定於細胞裂解毛細管壁上。

於此裝置中，在細胞裂解毛細管內，將經由樣品入口注入之樣品與磁珠混合，及當照射雷射光束時進行細胞裂解。振動器是用以將細胞裂解毛細管內的樣品與磁珠混合之裝置，可為能夠產生振動之任何裝置。雷射產生器為用以提供雷射光束至細胞裂解毛細管的裝置，能夠發射具有特定波長或之雷射光束或具有二或更多波長之光。藉由雷射能量將磁珠煮沸。

於此裝置中，振動器可包括音波振動器(sonicator)、使用磁

場之振動器、使用電場之振動器、機械振動器(例如漩渦攪拌器等等)、及壓電材料。

於此裝置中，磁力產生器係位於雷射路徑之上方，可為一電磁鐵，其於細胞裂解毛細管內之磁珠煮沸時被啟動。

此裝置可進一步包括一 DNA 放大室，其經由一通道連接至該細胞裂解毛細管，通道是藉由一閥以開啟或關閉。

於此裝置中，細胞裂解毛細管指具有毛細管形狀之容器。

依據本發明之另一方面，提供一種使用此核酸純化裝置以純化核酸之方法，該方法包括：將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；振動磁珠；在磁珠上照射雷射，以破裂細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒裂解物內之化合物與該磁珠結合；將結合著細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及獲得一不含磁珠之溶液。

依據本發明之另一方面，提供一種使用此核酸純化裝置以連續進行核酸純化及放大之方法，此方法包括：將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；振動磁珠；在磁珠上照射雷射，以破裂細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒

裂解物內之化合物與磁珠結合；將結合著細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及獲得一不含該磁珠之溶液，及將所得溶液經由連接容器與放大室之通道傳送至一放大室，以進行放大。

於此方法中，雷射可包括一脈波雷射或連續波(CW)雷射。

於此方法中，脈波雷射可為 1 mJ/脈衝或更多，及 CW 雷射可具有 10 mW 或更大的功率。於此方法之一具體實施例中，脈波雷射為 32 mJ/脈衝或更多，及 CW 雷射具有 10 W 或更大的功率。

於此方法中，雷射可具有波長在 400nm 或大於 400nm 之範圍。於此方法之一具體實施例中，雷射具有波長在 750nm 至 1300nm 之範圍。雷射可具有一或多個波長範圍。

於此方法中，磁珠之尺寸可為 50nm 至 1,000 $\mu$ m。於此方法之一具體實施例中，磁珠之尺寸為 1 至 50 $\mu$ m。磁珠可為二或更多種尺寸之珠子之混合物。

於此方法中，容器之直徑對長度的比例範圍在 1：2 至 1：50，及直徑範圍在 1nm 至 5mm。

於此方法中，容器可選自聚合物、有機材料、矽、玻璃、

及金屬所組成之組群。

於此方法中，磁珠可包括至少一種擇自鐵磁性 Fe、Ni、Cr、及其氧化物所組成組群之材料。

於此方法中，磁珠為塗覆著一鐵磁性金屬之聚合物、有機材料、矽、或玻璃。

於此方法中，磁珠可具有帶負電荷之表面。

於此方法中，溶液可擇自唾液、尿液、血液、血清、及細胞培養液所組成組群者。

### 【實施方式】

下文中將詳述本發明。

本發明有關一種細胞或病毒之核酸純化裝置，包括：一細胞裂解毛細管，其具有一入口，以經由此入口導入樣品及磁珠；一振動器，附接於細胞裂解毛細管，用以將細胞裂解毛細管內之樣品與磁珠混合；一雷射產生器，附接於細胞裂解毛細管，以提供雷射至細胞裂解毛細管；及一磁力產生器，附接於細胞裂解毛細管，以將磁珠固定於細胞裂解毛細管壁上。

第 1 圖為將使用微磁珠 1 及雷射 2 進行細胞裂解後之微磁

於本發明之一具體實施例中，磁力產生器係位於雷射路徑之上方，可為一電磁鐵，其於細胞裂解毛細管內之磁珠煮沸時被啟動。如第 1 圖所示，電磁鐵 8 應位於雷射路徑上方，因為若位於雷射路徑內部，磁珠會在吸附 PCR 抑制劑之前附接至電磁鐵，而導致降低吸附 PCR 抑制劑之效果。較佳在細胞裂解毛細管 3 中的磁珠煮沸時啟動電磁鐵。雖然在磁珠煮沸前啟動電磁鐵，但是磁力並不影響磁珠，此係由於磁珠與電磁鐵空間上的分離，使得磁珠無法附接至電磁鐵之故。此外，珠子尚應該磁化，以便藉由電磁鐵移除。

於本發明之一具體實施例中，核酸純化裝置可進一步包括一經由通道連接至細胞裂解槽的 DNA 放大室，此通道可藉由閥 9 開啟或關閉。為了實施 LOC 之目的，純化之 DNA 的放大系統是需要的。可使用光譜儀、微磁珠、電化學方法、電化學發光法、放射與螢光標籤、即時 PCR (real-time PCR) 法、及其類似者，檢測純化之 DNA。PCR 法最適合充分放大所欲之 DNA。亦可使用其他 DNA 放大方法，而亦可經由即時 PCR 法等等直接檢測。

於本發明之一具體實施例中，細胞裂解毛細管較佳具有直徑對長度的比例範圍在 1:2 至 1:50，及較佳具有直徑範圍在 1nm 至 5mm。

本發明亦有關一種使用核酸純化裝置純化核酸之方法，此方法包括：將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；振動磁珠；在磁珠上照射雷射，以破裂細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒裂解物內之化合物與磁珠結合；將結合著細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及獲得一不含磁珠之溶液。

於此方法中，對一含有磁珠之溶液照射雷射，由於雷射能量傳遞震波(shock wave)、蒸氣壓、及熱至細胞表面，使得磁珠導致燒蝕(ablation)。雷射燒蝕指曝露至雷射光束之材料所發生的一般現象。雷射燒蝕使材料表面溫度快速上升數百至數千度。若材料表面溫度上升至蒸發點或更高，依據液相材料之蒸發，表面上的飽和蒸氣壓會快速增加。

雷射所加熱之磁珠提高溶液溫度並直接使細胞破裂。磁珠於溶液中不單是做為熱的導體，亦對細胞表面施加熱震、機械振動、及物理振動，藉以有效率的使細胞表面破裂。

破裂細胞或病毒之裂解物包括抑制 PCR 之化合物。因此，為了有效進行 PCR，需要一自所得裂解物移除 PCR 抑制劑之分離步驟，此並不適於有效實施 LOC。於本發明之方法中，接附有 PCR 抑制劑之磁珠，藉由磁力產生器接附至細胞裂解毛細管壁，以便促進 PCR 之進行。

似者之泵(pump)進行。

於本發明之具體實施例中，雷射可包括脈波雷射或連續波(CW)雷射。

於雷射功率太低時，雷射燒蝕無法有效發生。對於 CW 雷射而言，雷射功率為 10 mW 至 300W，而對於脈波雷射而言，為 1 mJ/脈波至 1 J/脈波。較佳者為，脈波雷射為 32 mJ/脈波至 1 J/脈波，而 CW 雷射具有 10 W 至 300 W。當 CW 雷射小於 10 mW 及脈波雷射小於 1 mJ/脈波時，無法傳送充分的能量以使細胞破裂。當 CW 雷射大於 300 W 及脈波雷射大於 1 J/脈波時，DNA 被損壞。

於本發明之具體實施例中，所產生之雷射應在磁珠能吸收雷射能量的特定波長範圍內。產生的雷射較佳在 400 nm 或更長之波長範圍內，及更佳在 750 nm 至 1300 nm 之波長範圍內。此係因為 DNA 於短於 400 nm 之波長下會變性或損壞。所產生之雷射亦可為一或多種波長範圍。即，雷射可具有上述範圍內之一種波長或二或更多種不同的波長。

於本發明之具體實施例中，磁珠的直徑(尺寸)較佳為 50 nm 至 1,000  $\mu$ m，及更佳為 1  $\mu$ m 至 50  $\mu$ m。當磁珠直徑小於 50 nm 時，物理及機械振動並不足以引起細胞裂解。當磁珠直徑大於

1,000  $\mu\text{m}$  時，不適合 LOC 之用。磁珠亦可為具有二或多種尺寸之珠子混合物。即，磁珠可具有彼此相等的尺寸或為具有不同尺寸之珠子之混合物。

於本發明之一具體實施例中，容器之直徑對長度的比例範圍可在 1:2 至 1:50，及直徑範圍可在 1nm 至 5mm。含有珠子的相，非特定的(non-specifically)與玻璃壁結合，此在具有限直徑的毛細管內可有效發生。因此，若容器具有超過上述範圍的尺寸，相分離會變困難，而使純化效應降低。

於本發明之一具體實施例中，容器可選自聚合物、有機材料、矽、玻璃、及金屬所組成之組群。容器可由能夠固定珠子的任何材料所組成。

於本發明之一具體實施例中，磁珠可為任何磁化之材料。特言之，磁珠較佳包括至少一種擇自鐵磁性 Fe、Ni、Cr、及其氧化物所組成組群之材料。

於本發明之一具體實施例中，磁珠可為塗覆著一鐵磁性金屬之聚合物、有機材料、矽、或玻璃。

於本發明之一具體實施例中，磁珠表面較佳帶負電，使得 DNA 不附接至磁珠。因為 DNA 帶負電，由於相斥力之故，不

會附接至帶負電的磁珠。負電荷可為  $\text{COO}^-$ 。因為 DNA 帶負電時，由於相斥力之故，不能附接於也帶負電的磁珠上。當 DNA 附接至磁珠時，於細胞破裂後難以將 DNA 與磁珠分離，使得 DNA 純化更困難。

於本發明之一具體實施例中，溶液可擇自唾液、尿液、血液、血清、及細胞培養液所組成之組群。溶液可為具有核酸(例如動物細胞、植物細胞、細菌、病毒、嗜菌體、及類似者)之任何溶液。

參照下列實例更詳述本發明。下列實例僅供說明之目的，不欲限制本發明之範疇。

#### 製備例 1：細胞裂解系統

如第 1 圖所示，將如下述製備之 HBV ( $60\ \mu\text{l}$ )、血清( $30\ \mu\text{l}$ )、及微磁珠( $30\ \mu\text{l}$ ，挪威 Dynal 公司之 Dynabeads® M-270 羧酸(Carboxylic Acid))於毛細管中混合。於個別實驗中，於藉由渦流攪拌毛細管時，使用  $808\ \text{nm}$ ， $21.1\ \text{W}$  高功率雷射光束(德國 LIMO 公司之 HLU25F100-808)照射於混合物一段時間，以將細胞破裂(參照第 1 圖)。

#### 製備例 2：HBV、引子、及 PCR

使用下列 PCR 引子對(pair of PCR primers)檢測自細胞釋出

之 DNA：引子 TMP5-F (序列 ID 號碼：1)；及引子 TMP5-R (序列 ID 號碼：2)。此引子對位於 HBV 基因體之對應於第 2,269 至 2,387 核苷酸之部位。藉由 Taq 聚合酶(韓國 Takara 公司)進行 PCR 達 40 循環(於 50°C 下 10 分鐘及 95°C 下 1 分鐘以進行預變性(predenaturation)，於 95°C 作用 5 秒以變性，及於 62°C 作用 15 秒以緩冷配對(anneal)及延長(elongation))。使用商業可得之 DNA 500 化驗尺寸之試劑套組，於 Agilent BioAnalyzer 2100 (美國加州帕羅奧多市 Agilent 科技公司)內分析放大之 DNA。

#### 實例 1：磁珠相與 DNA 溶液相之分離

為探討磁珠相與含 DNA 溶液相之間依據容器形式之相分離程度，使用種種型態的容器觀察相分離的程度。第 2 圖顯示具有內徑 9.95mm 之容器，其中，於照射雷射後，磁珠相與 DNA 溶液相混合。參照第 2 圖，當容器內徑為 9.95mm 時，有 PCR 抑制劑(例如變性蛋白質及細胞碎片)附接在上面的磁珠不會附接在玻璃壁上，而是與含 DNA 的溶液混合，使得磁珠相與含 DNA 的溶液相並不分離。

第 3 圖顯示具有內徑 4.88mm 之容器，其中，於照射雷射後，磁珠相與 DNA 溶液相分離。第 3 圖的 A 顯示一容器，其中磁珠相與含 DNA 溶液相分離，及第 3 圖的 B 顯示 A 中所示之容器之放大圖。參照第 3 圖，可知當毛細管具有內徑為 4.88mm 時，有 PCR 抑制劑附接在上面的磁珠相與含 DNA 的

相清楚分離。即，含磁珠的相非特定的附接於玻璃壁上，此僅在具有直徑 5mm 或更小的毛細管才會發生。

### 實例 2：PCR 抑制劑與磁珠的結合

為鑑定 PCR 抑制劑是否與磁珠結合，進行 SEM 的觀察。第 4 圖顯示純的 Dynabeads<sup>®</sup> M-270 羧酸(carboxylic acid)的 SEM 照片。純的 Dynabeads<sup>®</sup> M-270 羧酸具有直徑為  $2.8 \mu\text{m} \pm 0.2$ ，及珠子於溶液中濃度為  $6 \times 10^7$  個珠子/ $30 \mu\text{l}$ 。參照第 4 圖，純的磁珠沒有沉積物。此外，因為 DNA 帶負電，所以並不會附接至磁珠。第 5 圖顯示在藉由雷射處理的細胞裂解後，Dynabeads<sup>®</sup> M-270 羧酸附接至玻璃壁的 SEM 照片。自第 5 圖顯然可知許多顆粒附接至磁珠。此等顆粒主要是變性蛋白質及細胞碎片，其為干擾 PCR 的主要 PCR 抑制劑。第 6 圖顯示在藉由雷射處理的細胞裂解後，從玻璃容器的中間部分取得的 Dynabeads<sup>®</sup> M-270 羧酸的 SEM 照片。自第 6 圖顯然可知許多顆粒附接至磁珠。因此，使用磁珠可輕易移除有 PCR 抑制劑作用的變性蛋白質及細胞碎片。

### 實例 3：依據 DNA 純化方法的 PCR 放大效應

為研究依據 DNA 純化方法的 PCR 放大效應，於 Lightcycler 毛細管中(內徑：2.42mm，高：35.40mm，內徑：高的比=1：14.63)進行細胞裂解，及然後使用所得之裂解物進行 PCR。第 7 圖顯示依據 DNA 純化方法之 PCR 產物之電泳結果。箭頭所指之帶

形(bands)對應於所欲之 PCR 產物。第 1 及 2 道(Lanes 1 and 2)為在磁珠不存在下分別於照射雷射 60 及 90 秒後進行 PCR 之結果，及第 3 及 4 道為在磁珠存在下分別於照射雷射 5 及 10 秒後進行 PCR 之結果。第 5 道顯示重組 HBV (rHBV)之直接 PCR 之結果，第 6 道是 PCR 正對照組，其中在使用 Qiagen Ultrasense 套組(kit)純化 DNA 後進行 PCR，及第 7 道是 PCR 負對照組，其中僅使用蒸餾水進行 PCR。各樣品具有如下表所示之組成。

| 樣品編號 | 血清  | 珠子  | rHBV |
|------|-----|-----|------|
| 1    | 50% | -   | 50%  |
| 2    | 50% | -   | 50%  |
| 3    | 25% | 25% | 50%  |
| 4    | 25% | 25% | 50%  |
| 5    | -   | -   | 100% |
| 6    | 50% | -   | 50%  |
| 7    | 蒸餾水 |     |      |

如第 7 圖所示，當僅進行雷射照射而無磁珠時(第 1 及 2 道)，未觀察到 PCR 產物，及當進行 rHBV 的直接 PCR 時(第 5 道)，未觀察到 PCR 產物。然而，於本發明之情形，即，當在磁珠存在下進行雷射照射(第 3 及 4 道)，可於所欲位置觀察到 PCR 產物。當在藉由 Qiagen Ultrasense 套組純化 DNA 後進行 PCR 時(第 6 道)，觀察到所欲之 PCR 產物。自此等結果明顯可知，本發明之方法顯示 PCR 效率類似於做為正對照

組之藉由 Qiagen Ultrasense 套組純化 DNA 之例，正對照組需要可觀的時間及許多純化步驟。因此，本發明之方法，因為不需要單獨的 DNA 純化步驟即能有效率的進行 PCR，而能有效應用於 LOC。

第 8 圖顯示經放大之 PCR 產物濃度。長條形(bars)代表經放大之 DNA 濃度( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )。藉由 Agilent BioAnalyzer 2100 對 PCR 產物定量。由第 8 圖顯然可知，使用本發明之方法的 PCR 結果類似於或優於使用 Qiagen Ultrasense 套組之 PCR 結果。因此，依據本發明之方法，不需單獨之純化程序即可輕易進行 PCR 以供 DNA 分析。

#### 實例 4：依據雷射照射時間比較蛋白質於溶液中之量

為研究細胞裂解後磁珠所吸附的蛋白質的量，依據雷射照射時間探討細胞裂解物中蛋白質的量。使用 CBQCA 蛋白質定量套組(C-6667, Molecular Probes, 參見製備手冊)，測量細胞裂解後之所得細胞裂解物中蛋白質之量。第 9 圖顯示依據雷射照射時間於細胞裂解物中之蛋白質的量。參照第 9 圖，細胞裂解物中蛋白質的量，在照射雷射 10 及 15 秒時，顯著減少。照射雷射 10 秒時，細胞裂解物中蛋白質的量顯著減少，顯示 PCR 放大被有效進行，其與第 7 及 8 圖之結果一致。

如上述，依據本發明之方法，因為可藉由毛細管內之相方離輕易將 PCR 抑制劑移除，所以可增加 PCR 產量。電磁鐵的使用能確保 PCR 抑制劑的移除。此外，因為可同時進行細胞裂解與 DNA 純化程序，所以可減少 LOC 步驟。

雖然已參照具體實施例特別顯示及敘述本發明，但應了解此技藝中之一般人士所做的形式上及細節的種種改變，並不背離如下列申請專利範圍所界定之本發明之精神及範疇。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖為使用微磁珠及雷射進行細胞裂解後分離微磁珠相與 DNA 溶液相所使用之系統之具體實施例示意圖。

第 2 圖顯示一具有內徑 9.95mm 之容器，於其內，磁珠相與 DNA 溶液相在照射雷射後被混合。

第 3 圖顯示一具有內徑 4.88mm 之容器，於其內，磁珠相與 DNA 溶液相在照射雷射後被分離。

第 4 圖顯示純的 Dynabeads® M-270 羧酸(carboxylic acid)之 SEM 照片。

第 5 圖顯示 Dynabeads® M-270 羧酸在照射雷射進行細胞裂解後接至玻璃壁上之 SEM 照片。

第 6 圖顯示在照射雷射進行細胞裂解後，自玻璃容器中間部位取得之 Dynabeads® M-270 羧酸之 SEM 照片。

第 7 圖顯示依據 DNA 純化方法之 PCR 產物之電泳結果。

第 8 圖顯示經放大之 PCR 產物濃度。

第 9 圖顯示依據雷射照射時間之細胞裂解物中蛋白質的量。

【主要元件符號說明】

|   |             |    |       |
|---|-------------|----|-------|
| 1 | 微磁珠         | 2  | 雷射    |
| 3 | 細胞裂解毛細管     | 4  | 樣品入口  |
| 5 | 振動器         | 6  | PCR 室 |
| 7 | 透光窗(window) | 8  | 電磁鐵   |
| 9 | 閥           | 10 | 螺旋蓋   |

## 五、中文發明摘要：

本發明提供一種純化細胞或病毒之核酸之裝置及方法。核酸純化裝置包括：一細胞裂解毛細管，其具有一入口，以經由此入口導入樣品及磁珠；一振動器，附接於毛細管，以將毛細管內之樣品與磁珠混合；一雷射產生器，附接於毛細管，以提供雷射至毛細管；及一磁力產生器，附接於毛細管，以將磁珠固定於毛細管壁上。依據本發明之方法及裝置，因為能夠藉由毛細管內相分離而便利的移除 PCR 抑制劑，所以能增加 PCR 產率。電磁鐵的使用能確保 PCR 抑制劑的移除。此外，由於能同時進行細胞裂解及 DNA 純化程序，所以能減少 LOC 步驟。

## 六、英文發明摘要：

An apparatus and method for purification of nucleic acids of cells or viruses are provided. The nucleic acid purification apparatus includes: a cell lysis capillary having a sample inlet through which samples and magnetic beads are introduced; a vibrator attached to the capillary and mixing the samples and the magnetic beads in the capillary; a laser generator attached to the capillary and supplying a laser to the capillary; and a magnetic force generator attached to the capillary and fixing the magnetic beads to a capillary wall. According to the method and apparatus, PCR yield can be increased since PCR inhibitors can be readily removed by means of a phase separation in a capillary. The use of an electromagnet ensures the removal of the PCR inhibitors. In addition, since cell lysis and DNA purification process can be simultaneously performed, LOC steps can be reduced.

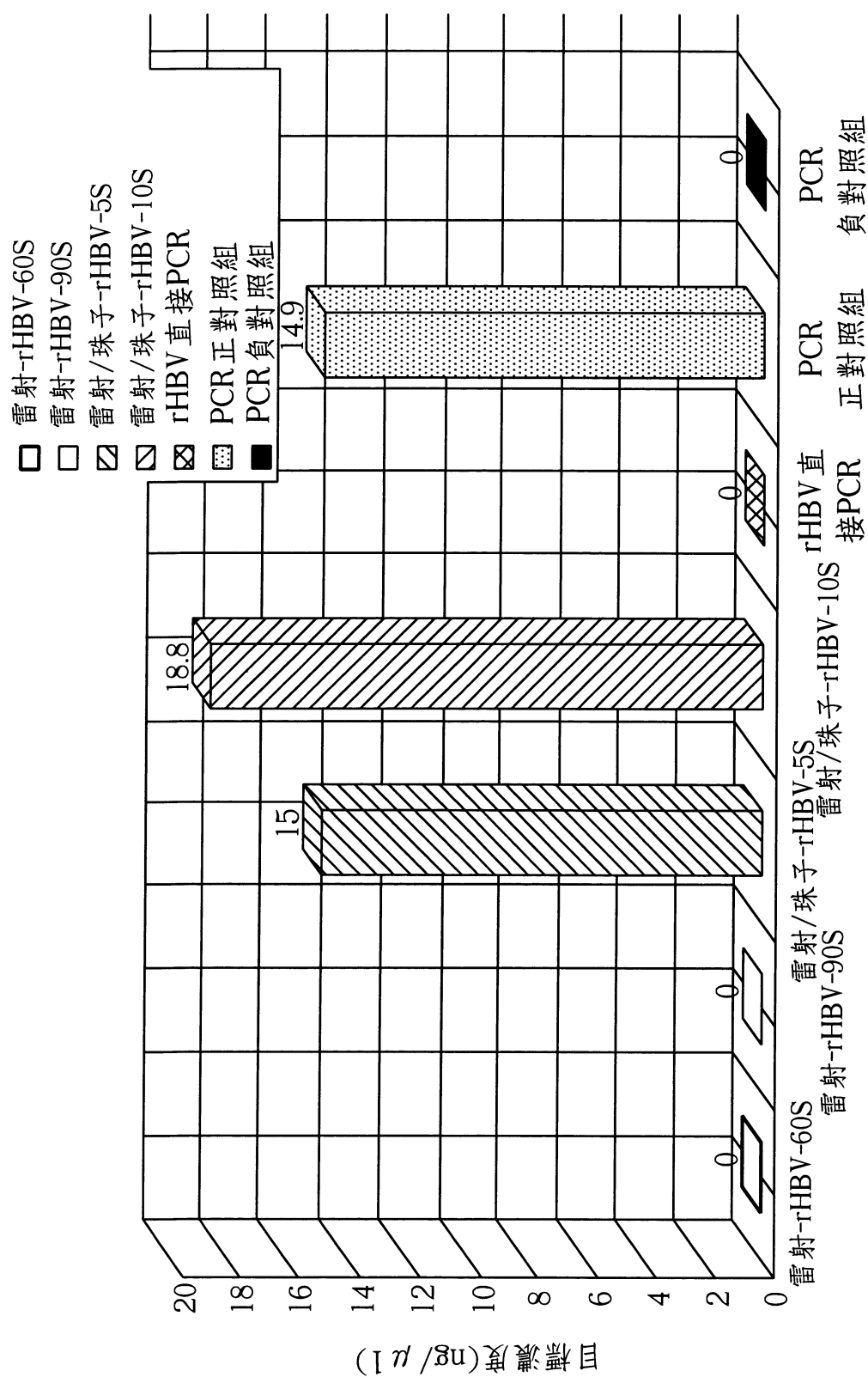
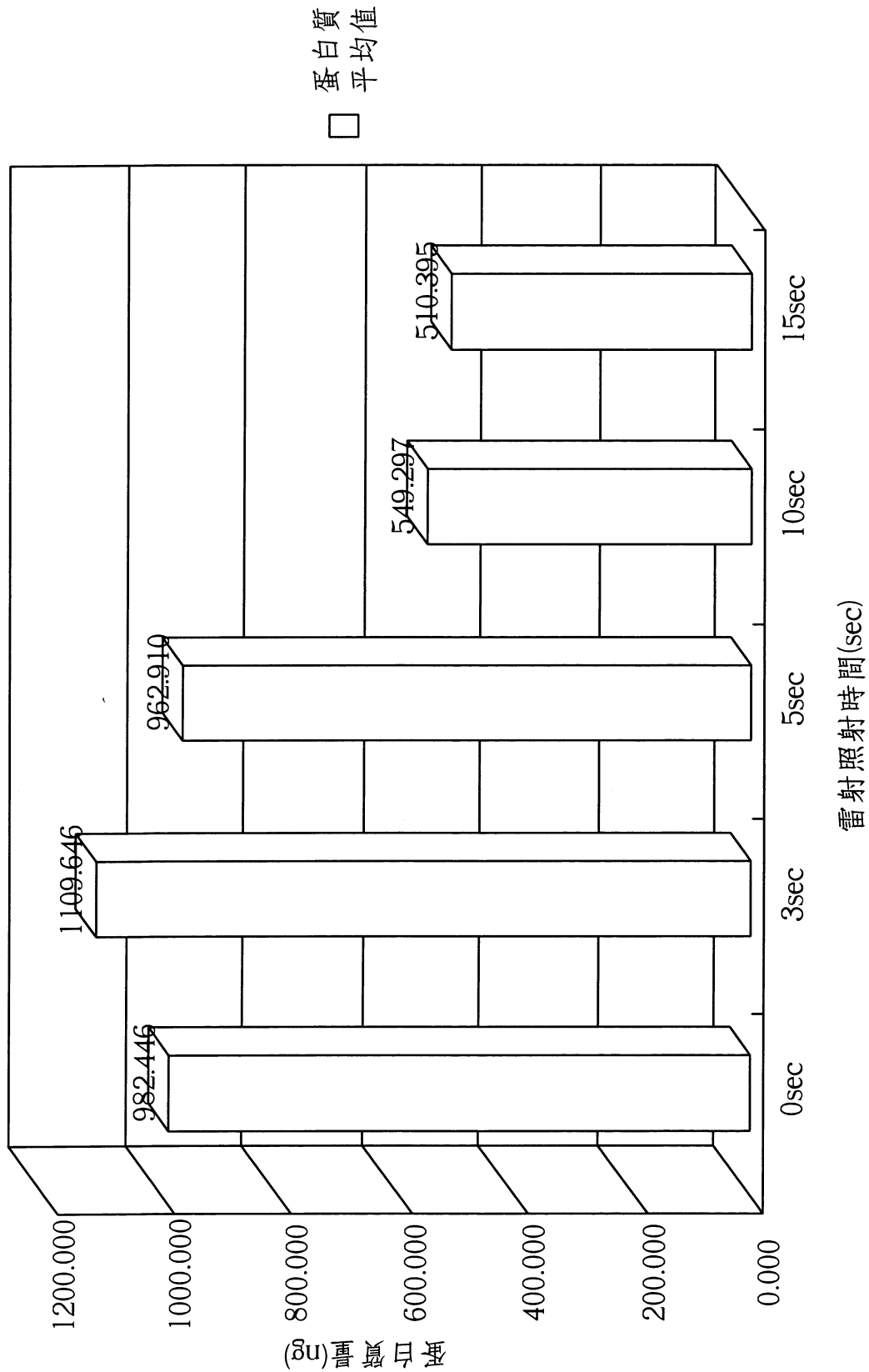


圖 8 策



第9圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

|   |             |    |       |
|---|-------------|----|-------|
| 1 | 微磁珠         | 2  | 雷射    |
| 3 | 細胞裂解毛細管     | 4  | 樣品入口  |
| 5 | 振動器         | 6  | PCR 室 |
| 7 | 透光窗(window) | 8  | 電磁鐵   |
| 9 | 閥           | 10 | 螺旋蓋   |

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

珠相與 DNA 溶液相分離所使用之系統之具體實施例示意圖。將樣品及磁珠經由樣品入口 4 注入細胞裂解毛細管 3，及然後藉由振動器 5 混合。當在振動下以雷射光束照射混合物時，曝露至雷射之磁珠藉由雷射燒蝕(laser ablation)作用，將光能轉化成熱。被雷射光束加熱的磁珠被煮沸，而 PCR 抑制劑，例如因煮沸而變性(denatured)的蛋白質及細胞碎片，則附接至磁珠上。附接有 PCR 抑制劑的磁珠則附接至毛細管壁上。如此，位於毛細管下部之含 DNA 溶液與位於毛細管上部的附接至毛細管壁上的大部分磁珠之間，發生相分離。將在毛細管下部相分離的含 DNA 溶液傳送至聚合酶鏈反應(PCR)室 6 以進行 PCR。此傳送可藉由使用電力、機械力、及類似者之泵(pump)進行。

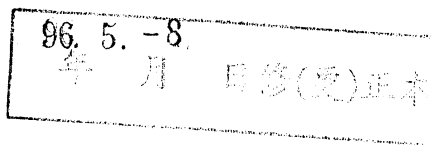
細胞裂解毛細管可由雷射可充分通過之材料所組成，或是具有此種材料之透光窗(window) 7。含有被分離的珠子的相，非特定的(non-specifically)與玻璃壁結合，此在具有限直徑的毛細管內更易發生。可使用一固定的電磁鐵 8 或永久磁鐵以確保分離相(separated phase)的定著(fixation)及選定定著區域。

於本發明之一具體實施例中，振動器可包括音波振動器、使用磁場之振動器、使用電場之振動器、機械振動器(例如漩渦攪拌器等等)、或壓電材料。振動器係附接至細胞裂解毛細管上，可為將細胞與微磁珠之混合溶液振動之任何裝置。

詳言之，附接有 PCR 抑制劑(例如因煮沸而變性(denatured)的蛋白質及細胞碎片)的磁珠藉由雷射能量而煮沸。附接有 PCR 抑制劑的磁珠則附接至容器壁上。如此，不含磁珠之含 DNA 溶液係位於容器下部，及大部分附接有 PCR 抑制劑之磁珠則附接至容器上部的玻璃壁上，因而輕易移除 PCR 抑制劑。此相分離在有限直徑的毛細管內能更有效率的發生。可使用固定之電磁鐵或永久磁鐵以確保分離相的定著及選定定著區域。

本發明亦有關一種使用此核酸純化裝置以連續進行核酸純化及放大之方法，此方法包括：將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；振動磁珠；在磁珠上照射雷射，以破裂細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒裂解物內之化合物與磁珠結合；將結合著細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及獲得一不含該磁珠之溶液，及將所得溶液經由連接容器與放大室之通道傳送至一放大室，以進行放大。

為了實施 LOC 之目的，需要連續進行核酸之分離、純化、及放大。如此，當經由連接毛細管狀容器與放大室之通道，將藉由磁珠純化之 DNA 溶液直接傳送至放大室時，可達成上述目的。將核酸傳送至放大室，可藉由使用電力、機械力、及類



## 十、申請專利範圍：

### 1. 一種細胞或病毒之核酸純化裝置，包括：

一細胞裂解毛細管，其具有一樣品入口，以經由此樣品入口導入樣品及磁珠；

一振動器，附接於該細胞裂解毛細管，用以將該細胞裂解毛細管內之該樣品與該磁珠混合；

一雷射產生器，附接於該細胞裂解毛細管，以提供雷射至該細胞裂解毛細管，使得該樣品破裂成第一碎片及第二碎片，該第一碎片附接於該磁珠，該第二碎片未附接於該磁珠；及

一磁力產生器，附接於該細胞裂解毛細管，以將該磁珠固定於該細胞裂解毛細管壁上，以將具有該第一碎片附接於其上之該磁珠與該第二碎片予以相分離。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之裝置，其中該振動器係擇自音波振動器、使用磁場之振動器、使用電場之振動器、機械振動器、及壓電材料所組成組群者。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之裝置，其中該磁力產生器係位於一雷射路徑之上方，且為一電磁鐵，其於該細胞裂解毛細管內之該磁珠煮沸時被啟動。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之裝置，進一步包括一 DNA 放

大室，其經由一通道連接至該細胞裂解毛細管，該通道是藉由一閥以開啟或關閉。

5. 一種使用如申請專利範圍第 1 項所述之裝置純化核酸之方法，該方法包括：

將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；

振動該磁珠；

在該磁珠上照射雷射，以破裂該細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒裂解物內之化合物與該磁珠結合；

將結合著該細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由一磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及

獲得一不含該磁珠之溶液。

6. 一種使用如申請專利範圍第 4 項所述之核酸純化裝置以連續進行核酸純化及放大之方法，該方法包括：

將含有細胞或病毒之溶液注射至一含有磁珠之毛細管狀容器；

振動該磁珠；

在該磁珠上照射雷射，以破裂該細胞或病毒，及將所得之細胞或病毒裂解物內之化合物與該磁珠結合；

將結合著該細胞或病毒裂解物內之化合物之磁珠，藉由一磁力產生器，固定於一毛細管狀容器壁上；及

獲得一不含該磁珠之溶液，及將所得溶液經由連接該容器與該放大室之一通道傳送至一放大室，以進行放大。

7. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該雷射包括一脈波雷射或連續波(CW)雷射。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中，該脈波雷射為 1 mJ/脈衝或更多，及該 CW 雷射具有 10 mW 或更大的功率。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該脈波雷射為 32 mJ/脈衝或更多，及該 CW 雷射具有 10 W 或更大的功率。

10. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該雷射具有波長在 400nm 或大於 400nm 之範圍。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該雷射具有波長在 750nm 至 1300nm 之範圍。

12. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該雷射具有一或多個波長範圍。

13. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該等磁珠之尺寸為 50nm 至 1,000  $\mu$  m。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中該等磁珠之尺寸為 1 至 50  $\mu\text{m}$ 。
15. 如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中該等磁珠為二或更多種尺寸之珠子之混合物。
16. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該容器之直徑對長度的比例範圍在 1:2 至 1:50。
17. 如申請專利範圍第 16 項所述之方法，其中該容器之直徑範圍在 1nm 至 5mm。
18. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該容器係選自聚合物、有機材料、矽、玻璃、及金屬所組成之組群。
19. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該等磁珠包括至少一種擇自鐵磁性 Fe、Ni、Cr、及其氧化物所組成組群之材料。
20. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該等磁珠為塗覆著一鐵磁性金屬之聚合物、有機材料、矽、或玻璃。
21. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該等磁珠具有帶負電荷之表面。

22. 如申請專利範圍第 5 或 6 項所述之方法，其中該溶液係擇自唾液、尿液、血液、血清、及細胞培養液所組成組群者。

十一、圖式：