

(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
2012 年 11 月 1 日 (01.11.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/145861 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/000746
- (22) 国际申请日: 2011 年 4 月 27 日 (27.04.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **北京大学 (PEKING UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **钟镐镐 (ZHONG, Hao-hao)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部病理系, Beijing 100191 (CN)。
- (74) 代理人: **中国专利代理 (香港) 有限公司 (CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.)**; 中国香港特别行政区湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 号楼, Hong Kong (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, 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, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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))。

(54) Title: METHODS OF NUCLEIC ACID LIQUID-PHASE EXTRACTION AND DETECTION

(54) 发明名称: 核酸液相提取及检测方法

(57) Abstract: The invention discloses a method of extracting nucleic acid analyte solution from biological sample, comprising: placing the biological sample into a heating container; optionally, adding solvent medium into the biological sample; heating the biological sample under high pressure; optionally, centrifuging the biological sample; and obtaining the solution including the nucleic acid analyte. The invention also discloses a method of detecting the nucleic acid analyte obtained by said extraction method.

(57) 摘要:

本发明公开了一种从生物样品中提取核酸分析物溶液的方法, 包括: 将生物样品置于加热容器中; 任选地, 向该生物样品加入溶解介质; 对该生物样品进行高压加热; 任选地, 对该生物样品进行离心; 和获取包含所述核酸分析物的溶液。本发明也公开了一种检测核酸分析物的方法, 该核酸分析物是用上述提取方法获得的。

WO 2012/145861 A1

核酸液相提取及检测方法

技术领域

本发明涉及核酸的提取和检测，更具体地说，本发明涉及利用高压加热从生物样品中液相释放核酸和对其进行检测的方法。

背景技术

基因检测在现代临床医学中的作用越来越重要。基因检测的第一步是从固定或未固定的生物样本中提取核酸。

传统的化学方法，通常先用酶消化细胞或组织，再经有机溶剂抽提，使被分离的核酸经过酒精或异丙醇沉淀，收集并浓缩于水中。整个过程需 2-3 天。特别是石蜡包埋组织，还需多次二甲苯脱蜡、高浓度蛋白酶长时间消化等步骤，低时效的劣势更为突出。

近些年，国内外研发了多种固相核酸提取试剂盒，原理大多为裂解细胞，释放核酸，核酸吸附于某些颗粒的表面，再进行沉淀或洗脱。这些方法相对缩短了核酸提取的时间，但距离低廉高效、简单易行的目标依旧太远。

随着基因检测不断上升的地位，核酸提取技术与涌现出的基因检测新方法、新技术相比较，一直没有得到同步的创新、突破。能否获得合格的核酸样本，已成为基因检测成败的关键。特别是高度依赖于石蜡包埋组织的基因型分析或诊断。

发明内容

本发明提供了一种从生物样品中提取核酸分析物溶液的方法，包括以下步骤：将该生物样品置于加热容器中；任选地，向该生物样品中加入溶解介质；对该生物样品进行高压加热；任选地，对该生物样品进行离心；和获取包含所述核酸分析物的液体。

本发明的方法特别适用于从福尔马林固定的石蜡包埋组织中提取核酸。该方法通过一步高压加热，同时完成石蜡包埋组织的脱蜡、裂解组织细胞、解交联等，直至液相释放核酸。

本发明还提供了一种对生物样品中的核酸分析物进行检测的方法，包括按照本发明的方法获得所述核酸分析物的溶液，以及对所述

核酸分析物进行检测，优选通过聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 进行检测。

本发明的方法操作简单（例如目前常用的核酸提取试剂盒需要20多个步骤），速度快，成本低，不需要特殊的设备和试剂，简单的操作
5 方法易于掌握，大大地提高了核酸溶液制备和检测的效率。

附图说明

图1A显示了K-ras exon 2的12密码子点突变（G12S），5' → 3'；
图1B显示了同一标本的反向测序结果（3' → 5'）。箭头表明突变
10 位点。

图2显示了人大肠癌K-ras exon 2的12、13密码子的正常序列。

图3显示了白色念珠菌荧光PCR的结果。其中纵坐标为荧光量，横坐标为PCR循环数，两条曲线为阳性结果。

图4显示了人血清HBV病毒575、241、192 bp HBV特异片段的电泳
15 结果。

图5显示的是一幅电泳图，其中：[1]人胃肠道间质瘤石蜡包埋组织；
[2]人大肠癌石蜡包埋组织；[3] 100bp标记物；[4] 人新鲜甲状腺癌组织；
[5] 培养细胞。

图6显示的是饱和蒸汽温度与压力关系对照表。

20

具体实施方式

本发明一方面提供了一种从生物样品中提取核酸分析物溶液的方法，包括以下步骤：将该生物样品置于加热容器中；任选地，向该生物样品中加入溶解介质；对该生物样品进行高压加热；任选地，对该
25 生物样品进行离心；和获取包含所述核酸分析物的液体。所述核酸分析物溶液通常可直接用于后续的检测，例如PCR。这大大简化了核酸提取的步骤。

本文所用的术语“核酸分析物”是指待分析的目标核酸分子，包括DNA和RNA。当样品中待分析的核酸为看家基因时，由于其拷贝数
30 较多，因此所获得的溶液中核酸的含量也较高，便于后续的PCR检测。当待分析的核酸拷贝数较低时，可以在采用本发明的方法获得核酸溶液后再进一步进行浓缩，例如通过色谱柱进行浓缩，以提高核酸浓度。

本文所用的术语“任选”表示“可有可无”或“非必需”的含义。
“任选地，对样品进行离心”是指可以进行离心，也可以不离心，这可以由本领域技术人员根据情况进行选择。

本文所用的术语“高压”是指比标准大气压更高的压力。例如，
5 在标准大气条件下海平面的气压为一个大气压，大约相当于101.3 kPa（千帕）。

本发明中的“高压”可以通过本领域常用的高压设备来实现，例如高压锅、电压力锅、高压蒸汽灭菌锅等。

最常用的高压设备是蒸汽加热设备。本领域公知，高压加热时的
10 温度通常会比常压加热时的温度更高。本领域有多种方法用于估算高压加热时压力与温度之间的对应关系（参见例如图6所示的“饱和蒸汽温度与压力关系对照表”）。可以根据这些方法粗略估算高压加热时的大致温度。例如，蒸汽压力锅的压力为250 kPa时，温度大约为127℃。

本发明中的“高压”通常在105 kPa以上，例如110 kPa、115kPa。
15 常用的蒸汽压力锅的压力上限大约为350 kPa。

本发明方法中所采用的“高压”可以在105-350 kPa之间，例如110-320 kPa，特别是115-250 kPa，优选120-200 kPa。

不同的生物样本对温度和压力的耐受力是不同的。本领域技术人员可以根据待测样本的性质，通过常规试验优化出最适当的高压温度
20 及时间。例如，当样品易于破碎时（例如肿瘤或病毒样本），加热压力和温度可以适当降低；当生物样品难于破碎（例如白色念珠菌）时，加热压力和温度可以适当增加。

根据压力和样品的不同，加热时间可以在5-210分钟范围内，例如10-90分钟，特别常用的加热时间是20-60分钟。本领域技术人员可以理
25 解，当加热压力较低并且样品中的核酸难于释放出来时，可以采用更长的加热时间，例如4小时。

例如，当对石蜡包埋组织切片样品进行处理时，典型的加热条件可以是：压力140-170 kPa，维持25-45分钟。当对白色念珠菌样品进行处理时，典型的加热条件可以是：压力140-170 kPa，维持45-60分钟。

30 本文所用的术语“生物样品”是指含有核酸的待测生物材料样品，包括来自动物、植物、微生物或人体的生物样品。生物样品可以是新鲜的、冰冻的或固定的各种样品，例如人体组织活检样品、肿瘤样品、

福尔马林固定的石蜡包埋组织样品，以及细菌、真菌、病毒、支原体等微生物样品。常见的新鲜的生物样品包括：生物流体样品，例如血液、血清、组织液、尿液、大便、痰液、脑脊液、唾液、眼泪、乳头吸出液和培养的细胞；肿瘤样品，例如从受试者体内取出的病变组织等。典型的固定的生物样品是10%福尔马林固定的石蜡包埋组织。本发明方法特别适合于石蜡包埋组织样品，包括较长期的留档蜡块及切片。

在对生物样品进行加热时，可以将样品放入加热容器中。常用的加热容器包括离心管和试管，例如容量为1.5 mL或10 mL的带盖离心管，优选在管盖上扎孔，以防高压加热过程中气体膨胀，崩开管盖。也可以将样品放入纱布封口的锥形瓶或烧瓶中，或其它透气的容器中加热。

在高压加热前，视情况，可以向生物样品中加入任选的溶解介质。例如，在对石蜡包埋组织切片进行加热前，可以加入0.1M NaOH溶液例如200 μ L或1ml，使样本完全浸入液体中。常用的溶解介质包括水、DEPC处理水、生理盐水、碱溶液和缓冲液等。常用的缓冲液包括Tris-盐酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、醋酸-醋酸钠缓冲液、甘氨酸-盐酸缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸钠缓冲溶液和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液等。本领域技术人员可以理解，在生物样品自身已经含有大量液体时（例如脑脊液），也可以不再额外加入溶解介质。

在高压加热步骤之后，可以任选地对样品进行离心，获取上清液。核酸通常溶于上清液中，可以直接用于后续操作，例如PCR。本领域技术人员可以理解，离心步骤并不是必需的，当核酸溶液不离心对后续实验（例如PCR）没有影响时，也可以不必离心。

在本发明的一个优选实施方式中，包括以下步骤：任选地，将离心管的管盖扎孔；将石蜡包埋组织切片（例如1-2片）置于离心管中，加入纯水或碱溶液（例如NaOH溶液），使样品浸入液体中；在140-200 kPa的压力下加热所述样品25-45分钟；和对所述样品进行离心，获取上清液。可以直接将该上清液用于后续的PCR反应。

本发明另一方面提供了一种对生物样品中的核酸分析物进行检测的方法，包括按照上文所述的方法获得所述核酸分析物的溶液，以及对所述核酸分析物进行检测。在一个特别优选的实施方式中，所述检测通过聚合酶链反应（PCR）进行。

下面将结合实施例对本发明作进一步说明。提供这些实施例是为了帮助理解本发明，不得解释为对本发明的限制。

实施例 1 人大肠癌 K-ras 2exon 基因检测

5 1. 准备离心管：用酒精灯烧红的注射器细针头，将 1.5ml 离心管管盖扎一微小细孔，以防高压过程中气体膨胀，崩开管盖。

2. 取材：取人大肠癌石蜡包埋组织切片（5-10 μ m）1-2 片置 1.5ml 离心管中，加入 0.1M NaOH (pH11)溶液 500 μ l，使样本完全浸入液体中。

10 3. 高压：高压加热 30-45 分钟（利仁牌电压力锅，型号 DYG-5B，工作压力为 140-170 kPa，限压压力 200 kPa。

4. PCR：高压完毕后，立即离心（13,000rpm，5 分钟），不需冷却。取上清液 1-2 μ l（或 1:10 稀释的上清液 1-2 μ l），按照试剂说明书进行 PCR。

15 5. 电泳：电泳检测 PCR 产物。如产物量过少，可进行巢式 PCR。

6. PCR 产物测序结果：见图 1A 和图 1B。

试验结果表明，通过高压加热方法，从石蜡包埋组织样品中获得的核酸样品，完全可以满足 PCR 产物直接测序的要求。

20 实施例 2 人大肠癌（激光微切割肿瘤细胞）K-ras exon2 基因检测

取激光微切割的石蜡切片肿瘤细胞若干，按照实施例 1 的方法进行操作（如细胞很少，减少溶液量），取上清液用于 PCR。PCR 产物测序结果见图 2。

25 以上结果表明，本发明的高压加热方法，适用于从微量的细胞中，获得质量可靠的核酸用于基因型分析和诊断。提高微量细胞或组织（例如细针穿刺肿瘤组织）基因型分析和诊断的成功率，对于失去手术机会的肿瘤患者，选择治疗药物，意义重大。

30 实施例 3 石蜡包埋组织结核分枝杆菌核酸扩增检测

取疑似结核杆菌感染的石蜡包埋组织切片 1-2 片，按照与实施例 1 基本相同的方法进行操作，其中加热时间为 20-30 分钟，取上清液用于

Real time PCR(PCR 预混液中增加荧光探针)。

结果表明, 用高压加热法, 可以从石蜡包埋组织中得到质量合格的细菌 DNA, 协助临床做出结核分枝杆菌感染的鉴别诊断。

5 实施例 4 白色念珠菌基因检测

取疑似白色念珠菌感染的的人体病灶拭子, 洗脱于 200 μ l 0.1M NaOH(pH11)溶液中, 按照与实施例 1 基本相同的方法进行操作, 其中加热时间为 35-50 分钟, 取上清液用于荧光 PCR(PCR 预混液中增加荧光探针)。结果见图 3。

10 白色念珠菌属真菌族, 大于细菌几倍至几十倍。细胞壁很厚, 实验时一般的方法较难裂解包被, 因此影响了 PCR 的灵敏性。近年, 真菌感染明显上升, 与滥用抗生素引起菌群失调和应用激素、抗癌药物导致免疫低下有关。致病真菌含多种类型, 它们的耐药性不同, 目前从基因序列区分真菌类型更为准确。

15 以上结果表明, 对于细胞壁较厚且坚的真菌, 高压加热法尽显其优越性, 可轻松得到质量可靠的核酸, 以区分基因序列的方式, 直接鉴别真菌的种类。

实施例 5 人血清 HBV 病毒检测

20 取 5 μ l HBV 患者的血清, 与 200 μ l 0.1M NaOH(pH11)溶液混匀, 按照与实施例 1 基本相同的方法进行操作, 其中加热时间为 25-40 分钟, 取上清液用于 PCR。电泳结果见图 4。

以上结果表明, 使用高压加热法, 可以从微量血清中得到质量可靠的病毒核酸, 用于临床检测。

25

实施例 6 新鲜组织、石蜡包埋组织、培养细胞的 mRNA 检测

1、取材:

- a. 人胃肠道间质瘤石蜡切片 (5-10 μ m) 1-2 片
- b. 人大肠癌石蜡包埋组织 (5-10 μ m) 1-2 片
- 30 c. 人新鲜甲状腺癌组织 (1/2 米粒大小) 剪碎
- d. 培养细胞

将样本分别放入 1.5ml 离心管中, 加入 0.1M NaOH(pH11)溶液适

量，使样本完全浸入液体中，混匀。

2、高压：加热时间 30-45 分钟（工作压力为 140-170 kPa，限压压力为 200 kPa。

3、反转录：（提取 RNA 时，需及时高压并提前做好反转录预混液）当高压结束，瞬时离心后，打开离心管管盖，迅速将 2-5 μ l 上清液进行反转录，以防 RNA 快速降解。

反转录预混液：1X 反转录 buffer, 0.2mM dNTPs, 0.2 μ g 随及引物（或 0.2 μ M 特异引物），50 U M-mLV 反转录酶，0.01M DTT,加 DEPC 水至 20 μ l。

42 $^{\circ}$ C 60 分钟, 95 $^{\circ}$ C 5 分钟。

4、PCR：反转录完毕（可瞬时离心），取上清液 1-5 μ l，加入至 PCR 预混液中（含 1X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 0.4-0.5 μ M 特异引物，加水至 25-50 μ l。）PCR：94 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，（94 $^{\circ}$ C 30 秒 55 $^{\circ}$ C 30 秒 72 $^{\circ}$ C 20 秒，30-35 个循环）72 $^{\circ}$ C 2 分钟。

5、GAPDH mRNA RT-PCR 结果（电泳图-226bp）见图 5。

以上结果表明，高压加热法，可同时获得质量可靠的 DNA 与 RNA，并可同时用于检测特异的基因序列（DNA）和生物性标志物（mRNA）。

实施例 7 不同的温度和高压对生物样品释放核酸的影响

1、按照与实施例 1 相同的方法准备离心管

2、取材

(1) HBV 患者血清 5 μ l，与 100 μ l 0.1M NaOH(pH11)溶液混匀。

(2) HSV 患者拭子，洗脱于 100 μ l 0.1M NaOH(pH11)溶液中。

(3) 肿瘤患者石蜡包埋组织切片 7 μ M, 2 片，加入 500 μ l 0.1M NaOH(pH11)溶液。

3、高压锅类型

(1) 利仁牌电压力锅，型号 DYG-5B

(2) 台湾 CIRRUS CR-3560CG-M 高压灭菌锅

4、方法

分别用利仁牌电压力锅（型号 DYG-5B）和台湾 CIRRUS CR-3560CG-M 高压灭菌锅，以不同的温度，不同的时间，对以上三种生物样本进行高压处理。

5、结果

见表 1。实验结果表明，不同的生物样本，对高压时间和压力的耐受力存在差异。

表 1

样品名称	高压锅类型	加热时间(分钟)	加热温度(℃)	PCR 结果
HSV II (单纯疱疹病毒 II 型)	利仁电压力锅	30	115℃	+
人体拭子		60	115℃	+
		90	115℃	-
		210	115℃	-
	高压灭菌锅	5	130℃	+
		10	130℃	-
		15	130℃	-
HBV (血清)	利仁电压力锅	30	115℃	+
		60	115℃	+
		90	115℃	+
		210	115℃	+
	高压灭菌锅	5	130℃	+
		10	130℃	-
		15	130℃	-
		120	130℃	-
石蜡包埋组织 (β-actin)	利仁电压力锅	30	115℃	+
		60	115℃	+
		90	115℃	+
		210	115℃	-
	高压灭菌锅	5	130℃	+
		10	130℃	+
		15	130℃	+
		30	130℃	+
		120	130℃	+

注：“PCR 结果”一栏中的“+”表示阳性，“-”表示阴性。

权 利 要 求

1. 从生物样品中提取核酸分析物溶液的方法，包括以下步骤：
将该生物样品置于加热容器中；
任选地，向该生物样品中加入溶解介质；
5 对该生物样品进行高压加热；
任选地，对该生物样品进行离心；和
获取包含所述核酸分析物的液体。
2. 权利要求1的方法，其中所述的高压为105-350kPa，例如110-320 kPa，特别是115-250 kPa，优选120-200 kPa。
- 10 3. 以上权利要求之任一项的方法，其中所述高压加热步骤的持续时间为5-210分钟，例如10-90分钟，特别是20-60分钟。
4. 以上权利要求之任一项的方法，其中所述生物样品选自由组织活检样品、细胞样品、肿瘤样品和生物流体样品构成的组。
5. 以上权利要求之任一项的方法，其中所述生物流体样品选自由
15 血液、血清、组织液、尿液、大便、痰液、脑脊液、唾液、眼泪和乳头吸出液构成的组。
6. 以上权利要求之任一项的方法，其中所述生物样品为石蜡包埋组织。
7. 以上权利要求之任一项的方法，其中所述溶解介质选自由水、
20 DEPC处理水、生理盐水、碱溶液和缓冲液构成的组。
8. 以上权利要求之任一项的方法，包括以下步骤：
任选地，将离心管的管盖扎孔；
将石蜡包埋组织切片置于离心管中，加入纯水或碱溶液，使样品
浸入液体中；
25 在140-200 kPa的压力下加热所述样品25-45分钟；和
对所述样品进行离心，获取上清液。
9. 对生物样品中的核酸分析物进行检测的方法，包括：
按照以上权利要求之任一项的方法获得所述核酸分析物的溶液；
和
30 对所述核酸分析物进行检测。
10. 权利要求9的方法，其中所述检测通过聚合酶链反应进行。
11. 权利要求9-10之任一项的方法，其中所述核酸分析物为DNA或

RNA。

12. 权利要求9-11之任一项的方法，其中还包括对所述核酸分析物的溶液进行浓缩。

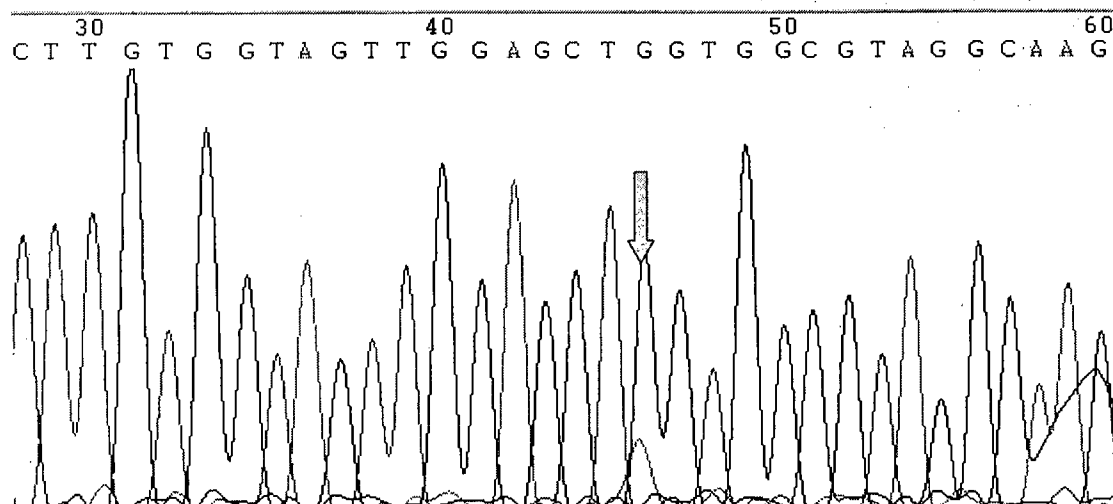


图 1A

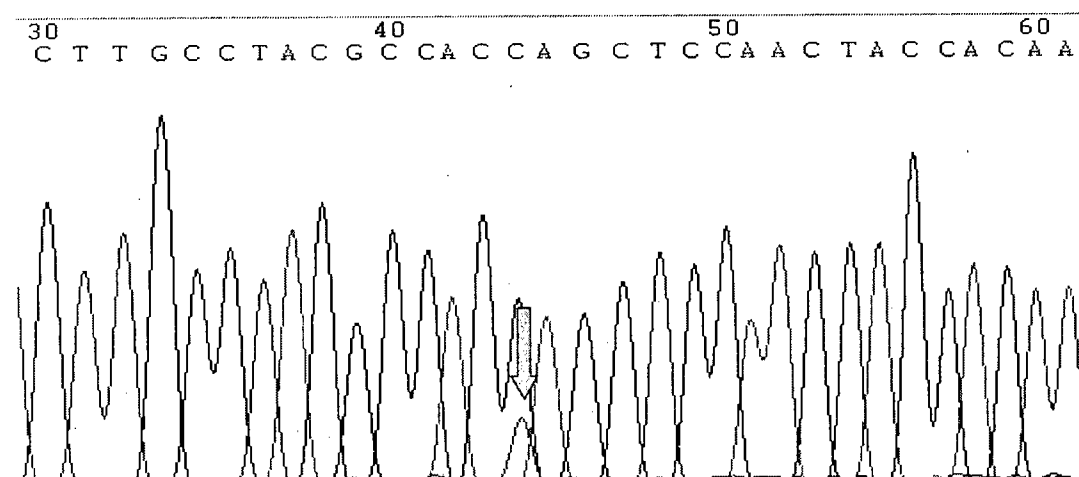


图 1B

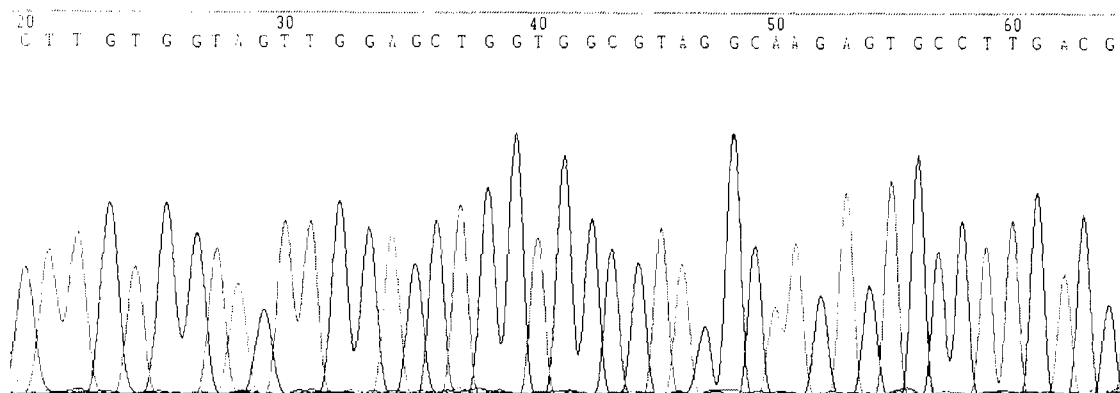


图 2

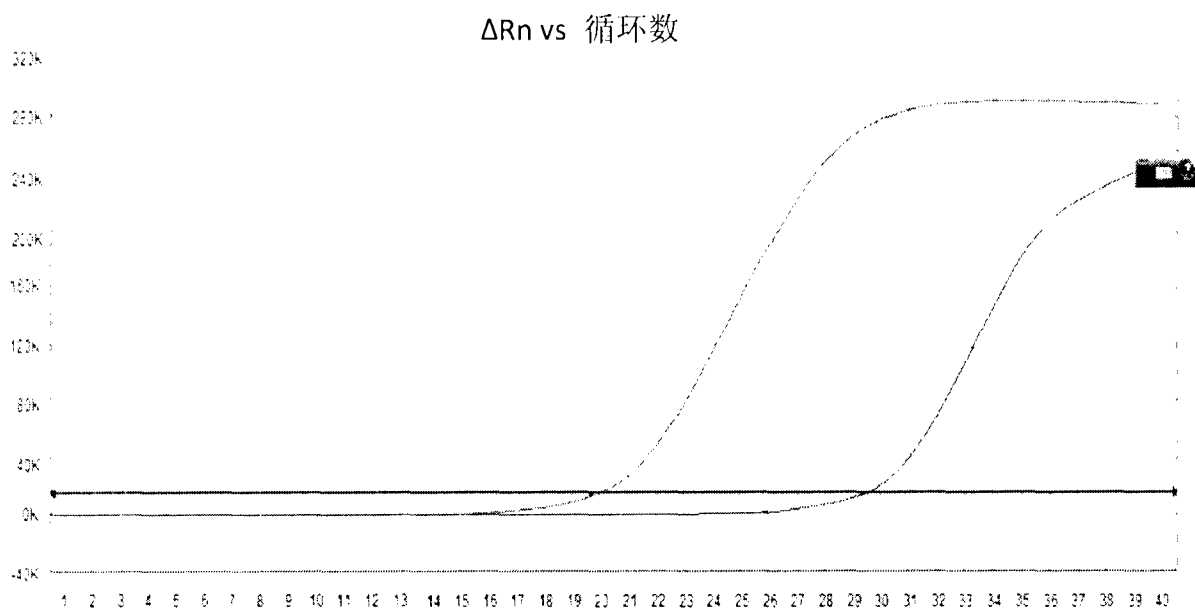


图 3

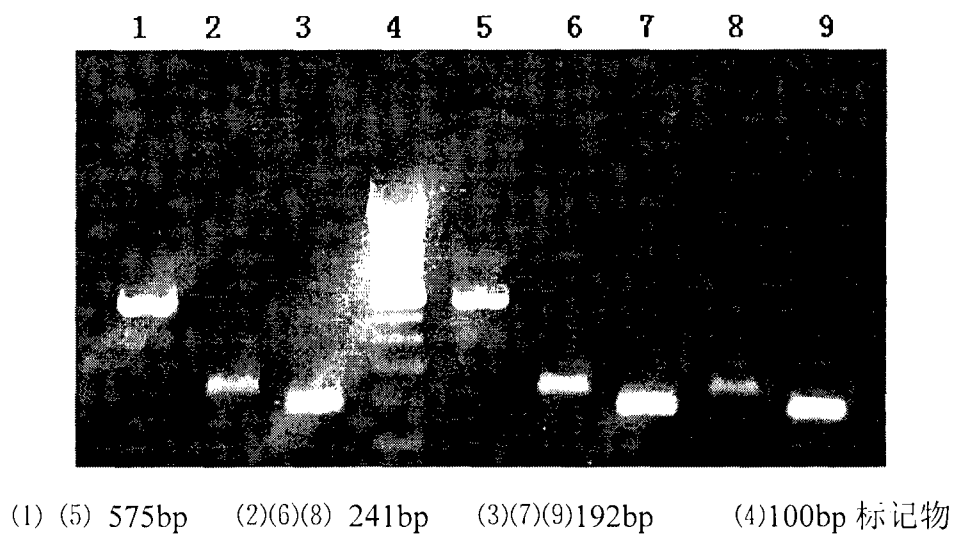


图 4

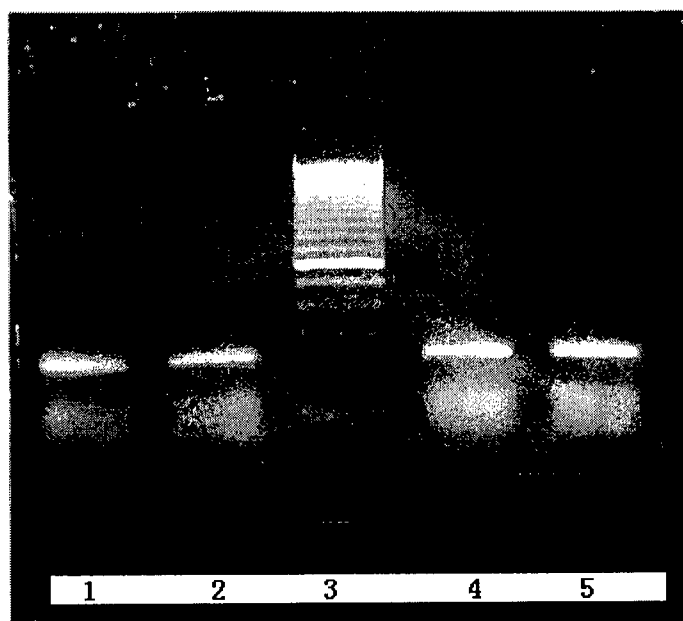


图 5

4/4

饱和蒸汽温度与压力关系对照表

温度 ℃	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
水蒸 气压 力 MPa	0.00264	0.00298	0.00336	0.00378	0.00424	0.0048	0.00532	0.00594	0.0066	0.00738
温度 ℃	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60
水蒸 气压 力 MPa	0.0082	0.0091	0.01009	0.01116	0.01234	0.0136	0.015	0.01651	0.0182	0.01992
温度 ℃	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80
水蒸 气压 力 MPa	0.02184	0.02391	0.02615	0.02856	0.03116	0.034	0.03696	0.04019	0.0437	0.04736
温度 ℃	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100
水蒸 气压 力 MPa	0.05133	0.05557	0.06011	0.06495	0.07011	0.0756	0.08146	0.08769	0.0943	0.10133
温度 ℃	102	104	106	108	110	112	114	116	118	120
水蒸 气压 力 MPa	0.10878	0.11668	0.12504	0.1339	0.14327	0.1532	0.16362	0.17465	0.1863	0.19854
温度 ℃	122	124	126	128	130	132	134	136	138	140
水蒸 气压 力 MPa	0.21145	0.22504	0.23933	0.25435	0.27013	0.2783	0.30407	0.32229	0.3414	0.36138
温度 ℃	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190
水蒸 气压 力 MPa	0.4155	0.476	0.5433	0.6181	0.7008	0.792	0.8924	1.0027	1.1233	1.2551

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/000746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See 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, C12Q

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;NCBI;CNKI;CNABS;ISI-WEB OF KNOWLEDGE;GOOGLE SCHOLAR: DNA, RNA, nucleic acid, extract, extraction, extracting, isolate, isolating, isolation, heating, high pressure, autoclave, high temperature, paraffin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TIAN, Ziqiang et al. Comparison of three methods of DNA extraction from formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissues. Basic Medical Sciences and Clinics.2004, vol.24, no 3, 335-338. See pages 335 -336	1-12
X	Shi SR et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of PH. J Histochem Cytochem. Aug.2002, vol.50, no 8, 1005-1011. See pages 1006-1007	1-12
A	WANG, Zhongfa. Development and application of an ultra-fast DNA extraction method of pathogenic microorganism. Chinese Journal of Health Laboratory Technology. Sep.2009, vol.19, no 9, 1979—1981. See the whole document	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 17 Jan.2012 (17.01.2012)	Date of mailing of the international search report 09 Feb. 2012 (09.02.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer TIAN, Yuan Telephone No. (86-10)62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/000746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/10 (2006.01) i

C12Q1/68 (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, C12Q

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;NCBI;CNKI;CNABS;ISI-WEB OF KNOWLEDGE;GOOGLE SCHOLAR: 核酸, DNA, RNA, 提取, 抽提, 分离, 方法, 高压, 高温, 加热, 压力, 石蜡, nucleic acid, extract, extraction, extracting, isolate, isolating, isolation, heating, high pressure, autoclave, high temperature, paraffin

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	田子强等. 甲醛固定石蜡包埋组织中 DNA 的三种提取方法比较. 基础医学与临床. 2004, 第 24 卷, 第 3 期, 335-338 参见 335- 336 页	1-12
X	Shi SR 等. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of PH. J Histochem Cytochem. 8 月 2002, 第 50 卷, 第 8 期, 1005-1011 参见 1006-1007 页	1-12
A	王忠发. 病原微生物 DNA 的超快速提取方法建立与应用. 中国卫生检验杂志. 9 月 2009, 第 19 卷, 第 9 期, 1979—1981 参见全文	1-12



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日的文件

“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

17.1 月 2012 (17.01.2012)

国际检索报告邮寄日期

09.2 月 2012 (09.02.2012)

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

田园

电话号码: (86-10) 62411047

A. 主题的分类

C12N15/10 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01) i