

(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
2020 年 6 月 18 日 (18.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/118655 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 19/34 (2006.01) *C12M 1/40* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/121092
- (22) 国际申请日: 2018 年 12 月 14 日 (14.12.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 方鑫(FANG, Xin); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
黄小罗(HUANG, Xiaoluo); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
沈玥(SHEN, Yue); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。徐讯(XU, Xun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 (DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳市福

田区金田路与福华路交汇处现代商务大厦2201, Guangdong 518048 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, 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, 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, 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)。

(54) **Title:** NUCLEIC ACID SYNTHESIS AND PURIFICATION DEVICE, USE THEREOF, AND NUCLEIC ACID SYNTHESIS AND PURIFICATION METHOD

(54) 发明名称: 核酸合成装置和纯化装置、其用途及核酸合成方法和纯化方法

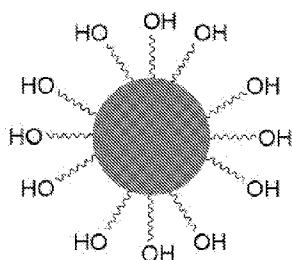


图 3

(57) **Abstract:** A nucleic acid synthesis and purification device, a use thereof, and a nucleic acid synthesis and purification method. The nucleic acid synthesis device comprises a solid phase carrier, wherein the solid phase carrier comprises a controlled pore glass (CPG); the CPG is an unmodified naked CPG, and a surface thereof has hydroxyl; the hydroxyl is used as a start point of nucleic acid synthesis, and the CPG is used for linking a phospholipid-protected nucleotide monomer or polymer by covalently bonding so as to perform nucleic acid synthesis. The nucleic acid synthesis device of the present invention can be used for not only synthesis of an oligonucleotide primer, but also for enzyme digestion and purification of a PCR product by using the oligonucleotide primer fixed on CPG, and has advantages of simple structure, small volume, light weight, high efficiency, low costs, and diversified functions.

(57) **摘要:** 一种核酸合成装置和纯化装置、其用途及核酸合成方法和纯化方法, 该核酸合成装置包括固相载体, 该固相载体包括可控孔径玻璃球(CPG), 该CPG是未被修饰的裸CPG, 其表面具有羟基, 羟基用作核酸合成的起始点, 用于通过共价键合连接亚磷酸保护的核苷酸单体或多聚体以进行核酸合成。本发明的核酸合成装置, 不仅可以用于寡核苷酸引物的合成, 还可以利用固定在CPG上的寡核苷酸引物进行酶切、PCR产物的纯化等, 具有结构简单、体积小、重量轻、效率高、成本低、功能多样的优点。



本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

核酸合成装置和纯化装置、其用途及核酸合成方法和纯化方法

技术领域

本发明涉及核酸合成技术领域，具体涉及一种核酸合成装置和纯化装置、其用途及核酸合成方法和纯化方法。

背景技术

经典的 DNA 合成柱，包含固相载体、筛板和空柱管。固相载体通常用可控孔径玻璃球（Controlled Pore Glass, CPG），CPG 球体内部有很多不规则的孔道，孔隙网络庞大，孔道的大小称为孔径，孔径稳定，通常选择孔径 500 埃（Å）和 1000Å 的 CPG 用于 DNA 合成，也可以选择其它孔径。筛板通常用超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）粉末烧结而成。在 DNA 合成柱中，筛板的作用是阻挡 CPG 不漏下来而合成试剂能够通过。空柱管为聚丙烯注塑而成。

第二代 DNA 通用合成柱由含可控孔径玻璃球的滤芯（Controlled Pore Glass Frits, CPG Frits）和空柱管构成。CPG Frits 是 CPG 和 UHMW-PE 或 HDPE 粉末烧结而成。PE 颗粒包裹并固定 CPG 颗粒，PE 颗粒之间搭桥形成一定的孔径，CPG 颗粒均匀地嵌入 PE 搭桥而成的刚性网状结构中，形成具有确定孔径和孔隙率的筛板。引物合成过程中，合成试剂流经 CPG 内部孔道与 PE 搭桥形成的孔道，使试剂流道足够长，从而增加化学反应的时间以及反应物与 CPG 上的反应位点接触的机会。聚合物的包裹作用使 CPG 颗粒固定，不会因为试剂的流动而发生转动，进一步延长了试剂和 CPG 上的反应位点的接触时间，提高了合成效率和产物纯度。

目前引物等寡核苷酸的合成普遍采用第二代 CPG Frits 合成柱，其中 CPG 为二氧化硅材质，被广泛用作固相合成寡核苷酸的载体，通常带有化学基团的通用连接臂（Universal Linker）修饰，合成起始步骤为用三氯乙酸（TCA）去除 CPG 所连的连接臂上的 DMT 保护基，获得游离的 5'-羟基供下一步与亚磷酰胺单体发生缩合反应，合成完毕经过氨解后处理，连接在 CPG 上的寡核苷酸会被切下来，经过纯化可用于后续实验，而达不到固定寡核苷酸的效果。由于所使用的 PE 材料具有超强的疏水性，CPG 被包裹其中，因此这种合成柱也不能吸收酶切、PCR 等反应溶液。

DNA 的分离纯化是分子生物学操作中的关键步骤，分离的 DNA 可以用于下游基因克隆、

探针制备等实验。DNA 的分离纯化通常包括两种类型：1) 总 DNA 提取。这种分离纯化，只需要将组织、细胞或体外 DNA 合成反应产物中的其它杂质去除，然后通过物理或者化学的方法分离出所需要的所有 DNA 遗传物质即可。2) 特异 DNA 提取。这种分离纯化通常需要根据实验目的，对组织、细胞或者体外 DNA 合成扩增产物中的特异 DNA，包括某一功能类型的 DNA（比如质粒 DNA）、某一长度的 DNA 或者某一序列特异的 DNA 进行提取。

目前实验室常用的 DNA 分离纯化方法包括硅胶膜离心吸附柱法以及磁珠吸附法。两种方法的核心原理类似，均是通过硅胶膜或者磁珠表面键合的基团，在一定的缓冲液条件下，同 DNA 表面所带的电荷进行吸附，从而将目的 DNA 分离纯化。这两种方法都已经被开发为成熟的商业试剂盒，在市场上能够买到。以 TIANGEN 公司的通用型 DNA 纯化回收试剂盒为例，该试剂盒采用独特的缓冲体系和离心吸附柱，既可从 TAE 或 TBE 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段，又可用于直接纯化 PCR 产物，同时除去蛋白质、其它有机化合物、无机盐离子及寡核苷酸引物等杂质，能够满足多种实验需要。溶胶液中含有 pH 指示剂，可根据颜色来判断溶胶状态。凝胶回收试剂盒的原理是：在凝胶融化液中凝胶块被迅速融化并释放出 DNA，加入高离液序列溶液后 DNA 片断被选择性吸附到硅胶膜上，经漂洗液洗涤去除残留在硅胶膜上的杂质和高浓度盐离子后，吸附到硅胶膜上的 DNA 片断经洗脱缓冲液或水洗脱下来，即可用于各种分子生物学实验。磁珠吸附法核酸提取为运用纳米技术对超顺磁性纳米颗粒的表面进行改良和表面修饰后，制备成超顺磁性氧化硅纳米磁珠。该磁珠能在微观界面上与核酸分子特异性地识别和高效结合。利用氧化硅纳米微球的超顺磁性，在 Chaotropic 盐（盐酸胍、异硫氰酸胍等）和外加磁场的作用下，能从血液、动物组织、食品、病原微生物等样本中将 DNA 和 RNA 分离出来，可应用于临床疾病诊断、输血安全、法医学鉴定、环境微生物检测、食品安全检测、分子生物学研究等多种领域。

实验室常用的 DNA 回收方法，成本相对较高，操作流程也比较繁琐和复杂，无法对特异 DNA 序列进行纯化，并且需要使用含有有毒化学试剂的缓冲液。

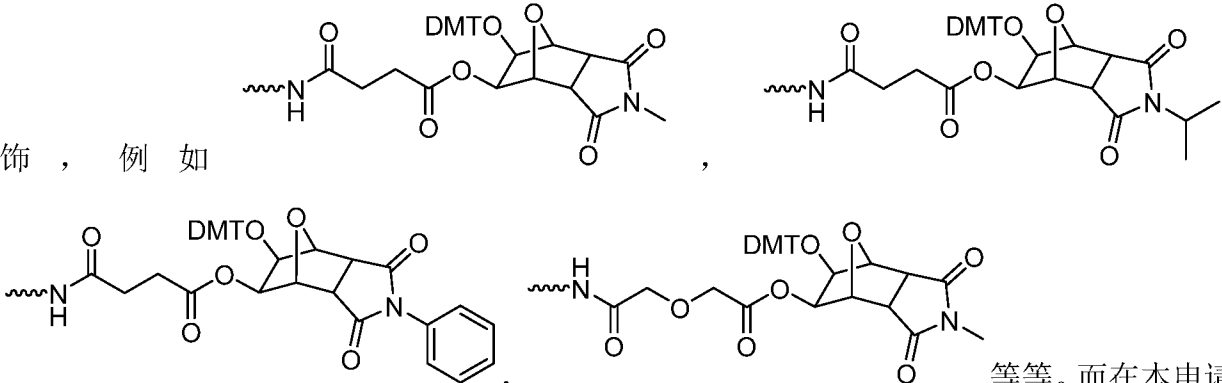
发明内容

本发明提供一种核酸合成装置和纯化装置、其用途及核酸合成方法和纯化方法，核酸合成装置不仅可以用于寡核苷酸序列的合成，还可以利用固定在 CPG 上的寡核苷酸序列进行酶切产物、PCR 产物的纯化等，具有结构简单、体积小、重量轻、效率高、成本低、功能多样的优点；核酸纯化装置能够对特异核酸序列进行纯化，具有高效、快速、方便、安全无毒的优点。

根据第一方面，一种实施例中提供一种核酸合成装置，包括固相载体，该固相载体包括可控孔径玻璃球（CPG），CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面具有羟基，羟基可通过共价键合连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体以进行核酸合成。

本领域普通技术人员熟知，目前寡核苷酸的合成普遍采用第二代 CPG Frits 合成柱，其中 CPG 为二氧化硅材质，并且 CPG 表面通常带有化学基团的通用连接臂（Universal Linker）修

饰，例如



等等。而在本申请中，CPG 是未被修饰的裸 CPG，是指 CPG 表面富含硅羟基，并且 CPG 表面未带有任何化学基团修饰，如连接臂（Universal Linker）修饰等。

在优选实施例中，上述核酸是 DNA，相应地，上述核酸合成装置是 DNA 合成装置。

在优选实施例中，上述 CPG 的孔径为 500Å（埃）至 2000Å。

在优选实施例中，上述核酸合成装置还包括筛板，上述筛板包括上筛板和下筛板，上述 CPG 置于上述上筛板和下筛板之间。

在优选实施例中，上述上筛板经过亲水处理或选自亲水材料，上述下筛板选自疏水材料。

在优选实施例中，上述固相载体还包括热塑性聚合物树脂，上述热塑性聚合物树脂与 CPG 烧结形成含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）。

在优选实施例中，上述热塑性聚合物树脂选自聚乙烯，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。

在优选实施例中，上述烧结的温度是 160℃ 至 250℃，优选 180℃。

在优选实施例中，上述 CPG Frits 的直径 ≤ 3.5mm，厚度 ≥ 1.5mm。

在优选实施例中，上述 CPG Frits 的直径为 3mm，厚度为 4mm。

在优选实施例中，每个 CPG Frits 含有 0.1-10mg CPG，优选 4mg CPG。

在优选实施例中，上述 CPG Frits 是亲水性的 CPG Frits。

在优选实施例中，上述亲水性的 CPG Frits 是通过亲水处理获得的 CPG Frits。

在优选实施例中，上述亲水处理是先用醇类溶剂润湿，再键合上表面活性剂。

在优选实施例中，上述醇类溶剂为含 C1-10 直链或支链的醇类溶剂，优选为甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、乙二醇、甘油、及它们的含水溶剂或它们的组合，更优选为 95% (v/v) 的乙醇；

上述表面活性剂为阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂，优选为十二烷基硫酸钠、苯扎溴铵、聚山梨酯、脂肪酸山梨坦、季铵化物、卵磷脂、氨基酸或它们的组合。

在优选实施例中，上述核酸合成装置还包括容纳装置，上述固相载体置于上述容纳装置中。

在优选实施例中，上述容纳装置是空柱管。

在优选实施例中，上述空柱管内预留至少一个装配位，上述装配位是圆柱体，上述固相载体呈圆柱状，使上述固相载体与上述装配位完全切合，上述装配位的高度大于上述固相载体的厚度。

在优选实施例中，上述空柱管的柱长为 70 mm，空柱管上部内径为 4.52mm，到上述装配位上部逐渐收口至 3mm，上述装配位的内径为 2.95mm，上述装配位的高度为 5mm。

根据第二方面，一种实施例中提供一种核酸合成设备，包括如第一方面的核酸合成装置。

根据第三方面，一种实施例中提供一种第一方面的核酸合成装置在核酸合成中的用途。

在优选实施例中，使用固相亚磷酰胺三酯法进行上述核酸合成。

根据第四方面，一种实施例中提供一种核酸合成方法，包括使用第一方面的核酸合成装置或第二方面的核酸合成设备进行核酸合成，上述核酸合成装置中 CPG 表面的羟基用作待合成核酸的合成起始点，通过共价键合连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体。

在优选实施例中，上述方法是固相亚磷酰胺三酯法。

根据第五方面，一种实施例中提供一种核酸纯化装置，包括固相载体，固相载体包括可控孔径玻璃球 (CPG)，CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面具有羟基，羟基通过共价键合连接一段寡核苷酸序列，寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对。

在优选实施例中，上述寡核苷酸序列与待纯化核酸的 3'端或/和 5'端的一段区域全部或部

分特异性互补配对或随机配对。

在优选实施例中，上述寡核苷酸序列的长度是 6 至 12 个碱基长度。

在优选实施例中，上述待纯化核酸是 DNA，相应地，上述核酸纯化装置是 DNA 纯化装置。

在优选实施例中，上述待纯化核酸是生物学反应产物，优选酶切产物或 PCR 产物。

在优选实施例中，上述 CPG 的孔径为 500Å（埃）至 2000Å。

在优选实施例中，上述核酸纯化装置还包括筛板，上述筛板包括上筛板和下筛板，上述 CPG 置于上述上筛板和下筛板之间。

在优选实施例中，上述上筛板经过亲水处理或选自亲水材料，上述下筛板选自疏水材料。

在优选实施例中，上述固相载体还包括热塑性聚合物树脂，上述热塑性聚合物树脂与 CPG 烧结形成含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）。

在优选实施例中，上述热塑性聚合物树脂选自聚乙烯，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。

在优选实施例中，上述 CPG Frits 的直径 $\leq 3.5\text{mm}$ ，厚度 $\geq 1.5\text{mm}$ 。

在优选实施例中，上述核酸纯化装置还包括容纳装置，上述固相载体置于上述容纳装置中。

在优选实施例中，上述容纳装置是空柱管。

在优选实施例中，上述空柱管内预留至少一个装配位，上述装配位是圆柱体，上述固相载体呈圆柱状，使上述固相载体与上述装配位完全切合，上述装配位的高度大于上述固相载体的厚度。

根据第六方面，一种实施例中提供一种核酸纯化设备，包括如第五方面的核酸纯化装置。

根据第七方面，一种实施例中提供一种核酸纯化方法，包括将含有待纯化核酸的溶液加入如第五方面的核酸纯化装置中孵育，使上述待纯化核酸与上述核酸纯化装置中的上述寡核苷酸序列全部或部分特异性互补配对或随机配对结合；然后将上述待纯化核酸从上述核酸纯化装置上洗脱下来。

在优选实施例中，上述待纯化核酸为单链核酸。

在优选实施例中，上述核酸纯化装置在与上述溶液孵育之前，先进行氨解脱保护处理。

在申请中，氨解脱保护处理是指，在氨解条件下脱去合成寡核苷酸所用单体或多聚体的杂环碱基氨基上的保护基团，以及磷酸羟基上的氰乙基保护基，使其恢复寡核苷酸本身的结构。

在优选实施例中，上述氨解脱保护处理在 90℃ 下进行 2 小时；然后，使用乙腈/水溶液和超纯水为流动相进行洗涤，离心，得到连接有上述寡核苷酸序列的核酸纯化装置后再与上述溶液孵育。

在优选实施例中，上述孵育之后，以乙醇/水溶液为流动相进行洗涤，除去未结合的核酸和/或酶和/或缓冲液，之后再将上述待纯化核酸从上述核酸纯化装置上洗脱下来。

在优选实施例中，上述将上述待纯化核酸从上述核酸纯化装置上洗脱下来，具体包括：在加热条件下，使配对结合的待纯化核酸和寡核苷酸序列变性解链，用加热超纯水将解开的单链待纯化核酸洗脱下来。

在优选实施例中，上述待纯化核酸从上述核酸纯化装置上洗脱下来后再进行退火，使互补单链恢复双螺旋结构。

根据第八方面，一种实施例中提供一种第五方面的核酸纯化装置在核酸纯化中的用途。

本发明的核酸合成装置中，CPG 是未被修饰的裸 CPG，不带通用连接臂（Universal Linker），表面暴露有一定数量的羟基，寡核苷酸引物等核酸合成完毕经过氨解后处理，连接在 CPG 上的寡核苷酸引物等核酸不会被切下来，仍然连接在固相载体上。因此，本发明的核酸合成装置能够同时实现合成核酸和固定核酸的目的，不仅可以用于寡核苷酸引物等核酸的合成，还可以利用固定在 CPG 上的寡核苷酸引物等核酸进行酶切产物、PCR 产物的纯化等，具有结构简单、体积小、重量轻、效率高、成本低、功能多样的优点。

本发明的核酸纯化装置，能够对特异核酸序列进行纯化，具有高效、快速、方便、安全无毒等优点，克服了现有的核酸分离纯化方法无法纯化特异 DNA 序列、操作复杂、效率低下、分离速度慢、经济成本高以及需要使用有毒化学试剂的缺陷。

附图说明

图 1 为本发明实施例中核酸合成柱或核酸纯化柱设计示意图，其中，1-空柱管；2-装配在空柱管内的 CPG Frits；

图 2 为本发明实施例中核酸合成柱或核酸纯化柱的 CPG Frits 横截面示意图，其中，3-PE 颗粒之间搭桥形成的刚性网状结构；4-不带通用连接臂（Universal Linker）、未被修饰的裸 CPG

颗粒；

图 3 为本发明实施例中核酸合成柱的 CPG 结构设计原理图，其中，未被修饰的裸 CPG 颗粒表面具有羟基（-OH）；

图 4 为本发明实施例中核酸纯化柱的 CPG 结构设计原理图，其中，未被修饰的裸 CPG 颗粒表面连接有一段寡核苷酸序列；

图 5 为本发明实施例中核酸纯化方法流程示意图；

图 6 为本发明实施例中纯化获得的 DNA 片段在 1.2% 琼脂糖凝胶上的电泳结果图，其中，1-使用连接有 6nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物；2-使用连接有 8nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物；3-使用连接有 10nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物；4-使用连接有 12nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物；M-DL2000 DNA Marker。

具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。在以下的实施方式中，很多细节描述是为了使得本发明能被更好的理解。然而，本领域技术人员可以毫不费力的认识到，其中部分特征在不同情况下是可以省略的，或者可以由其他元件、材料、方法所替代。

另外，说明书中所描述的特点、操作或者特征可以以任意适当的方式结合形成各种实施方式。同时，方法描述中的各步骤或者动作也可以按照本领域技术人员所能显而易见的方式进行顺序调换或调整。因此，说明书和附图中的各种顺序只是为了清楚描述某一个实施例，并不意味着是必须的顺序，除非另有说明其中某个顺序是必须遵循的。

本发明的一个实施例中提供一种核酸合成装置，该装置包括固相载体，该固相载体包括可控孔径玻璃球（CPG），该 CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面不携带化学基团的通用连接臂（Universal Linker），其表面具有羟基，羟基用作核酸合成的起始点，用于通过共价键合连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体以进行核酸合成。

本发明实施例中，CPG 表面的羟基与核苷酸的共价键合连接可以通过经典的固相亚磷酰胺三酯法实现，与现有技术不同的是，本发明实施例中采用的 CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面的羟基充当固相亚磷酰胺三酯法反应中 5'-羟基的作用与加入的亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体发生键合反应。

本发明的核酸合成装置适用于任何合适的核酸的合成，例如包括但不限于 DNA 和 RNA 等，优选 DNA 的合成。因此，在优选实施例中，本发明的核酸合成装置是 DNA 合成装置。

本发明实施例中，所采用的可控孔径玻璃球（CPG）球体内部有很多不规则的孔道，孔隙网络庞大，孔道的大小称为孔径，孔径稳定，通常选择孔径 500Å（埃）至 2000Å（优选 1000Å）的 CPG 用于本发明实施例的核酸合成装置的制备，也可以选择其它孔径。在具体应用中，可以根据具体情况，来确定所采用的可控孔径玻璃球（CPG）的孔径。

本发明实施例中，核酸合成装置可以设计成各种合适的形式。本发明提供两种示例性的形式。

在第一种形式中，核酸合成装置包括可控孔径玻璃球（CPG）和筛板，筛板包括上筛板和下筛板，可控孔径玻璃球（CPG）置于上筛板和下筛板之间，筛板可以采用超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）等热塑性聚合物树脂粉末烧结而成。筛板的作用是阻挡 CPG 不漏下来而合成试剂能够通过。上筛板可以经过亲水处理或使用亲水材料，下筛板可以使用疏水材料。此外，该核酸合成装置还包括容纳装置，可控孔径玻璃球（CPG）等固相载体以及任选的筛板置于容纳装置中，该容纳装置可以是空柱管，该空柱管可以采用聚丙烯注塑而成。

在第二种形式中，核酸合成装置包括可控孔径玻璃球（CPG）和热塑性聚合物树脂烧结形成的含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）作为固相载体。烧结的温度可以是 160℃ 至 250℃，优选 180℃。热塑性聚合物树脂可以选自聚乙烯或聚丙烯等，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。聚乙烯（PE）颗粒包裹并固定 CPG 颗粒，PE 颗粒之间搭桥形成一定的孔径，CPG 颗粒均匀地嵌入 PE 搭桥而成的刚性网状结构中，形成具有确定孔径和孔隙率的 CPG Frits。在寡核苷酸序列合成过程中，合成试剂流经 CPG 内部孔道与 PE 搭桥形成的孔道，使试剂流道足够长，从而增加化学反应的时间以及反应物与 CPG 上的反应位点接触的机会。聚合物的包裹作用使 CPG 颗粒固定，不会由于试剂的流动而发生转动，进一步延长了试剂和 CPG 上的反应位点的接触时间，提高了合成效率和产物纯度。在该种形式中，CPG Frits 呈圆柱状，其直径可以是任何合适的直径，例如直径≤3.5mm；厚度可以是任何合适的厚度，例如厚度≥1.5mm。优选地，CPG Frits 的直径为 3mm，厚度为 4mm。每个 CPG Frits 含有 0.1-10mg CPG，优选 4mg CPG。

由于核酸合成所使用的 PE 材料等具有超强的疏水性，而分子生物学反应如 PCR 反应等大多在水溶液中进行，这种疏水性材质限制了其进一步的应用，通过亲水处理，能够实现这种材质对水溶液的吸收，这将拓展其在合成生物学领域的广泛应用。因此，为提高 CPG Frits

的亲水性, CPG Frits 可以采用经亲水处理的 CPG Frits。亲水处理可以是先用醇类润湿, 再键合上表面活性剂。

其中, 醇类溶剂可以是含 C1-10 直链或支链的醇类溶剂, 优选甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、乙二醇、甘油、及它们的含水溶剂或它们的组合, 更优选为 95% (v/v) 的乙醇。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂, 优选十二烷基硫酸钠、苯扎溴铵、聚山梨酯、脂肪酸山梨坦、季铵化物、卵磷脂、氨基酸或它们的组合。

在一些优选实施例中, 本发明的核酸合成装置还包括容纳装置, CPG Frits 等固相载体置于容纳装置中, 该容纳装置可以是空柱管, 该空柱管可以采用聚丙烯注塑而成。

在一个优选实施例中, 容纳装置是空柱管, 固相载体 CPG Frits 制成圆柱状置于空柱管中, 空柱管内预留至少一个装配位, 装配位是圆柱体, 没有斜度, 固相载体呈圆柱状与空柱管完全切合, 装配位的高度大于固相载体的厚度。

在一个优选实施例中, 空柱管为聚丙烯注塑而成, 采用梯度直口设计, 预留的 CPG Frits 装配位是圆柱体, 没有斜度。空柱管的柱长为 70mm, 空柱管上部内径为 4.52mm, 到装配位上部逐渐收口至 3mm, 装配位的内径为 2.95mm, 装配位的高度为 5mm。

此外, 本发明的核酸合成装置中, 容纳装置除了使用空柱管以外, 还可以使用其他合适形式, 例如多孔板, 如 24 孔板、96 孔板、384 孔板等, 每个 CPG Frits、或 CPG 和筛板分别置于多孔板的每个孔中, 形成一种多孔板形式的核酸合成装置, 能够批量化进行核酸合成。

如图 1、图 2 和图 3 所示, 在本发明的一个示例性的实施例中, 核酸合成装置是核酸合成柱, 该核酸合成柱包括: 空柱管 1 和装配在空柱管内的 CPG Frits 2。其中, CPG 为不带通用连接臂 (Universal Linker)、未被修饰的裸 CPG 载体, 表面暴露有一定数量的羟基, CPG 的孔径为 1000Å。CPG Frits 2 由未被修饰的裸 CPG 颗粒 4 和热塑性聚合物树脂 (例如 PE) 烧结形成, PE 颗粒之间搭桥形成刚性网状结构 3。烧结温度可以是 160°C 至 250°C, 优选 180°C。烧结时间可以是 5 分钟至 10 小时等, 具体可以根据需要确定。图 3 示出, 裸 CPG 载体的表面暴露有一定数量的羟基 (-OH), 通过该羟基可以与待加入的亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体之间形成共价键合, 以进行核酸合成。

本发明的一种实施例中提供一种核酸合成设备, 设备包括本发明实施例的核酸合成装置。本发明的核酸合成设备, 除了包括本发明的核酸合成装置以外, 其他部分例如液路系统、气路系统、控制系统、传动系统等可以按照现有技术实施。例如, 将 Dr. Oligo 192 核酸合成仪

中使用的核酸合成装置替换为本发明的核酸合成装置，即可作为本发明的核酸合成设备的一个例子。

本发明的一种实施例中提供本发明的核酸合成装置在合成核酸的方法中的用途。合成的核酸可以是任何合适的核酸，例如包括但不限于 DNA 和 RNA 等，优选 DNA。

在优选实施例中，采用固相亚磷酰胺三酯法进行核酸的合成。例如，将本发明的核酸合成装置作为 Dr. Oligo 192 核酸合成仪中的合成柱，并在该合成仪上采用经典的固相亚磷酰胺三酯法合成一段寡核苷酸引物序列，即可实现本发明的目的。

本发明的一种实施例中提供一种核酸合成方法，该方法使用本发明的核酸合成装置或核酸合成设备进行核酸合成，核酸合成装置中 CPG 表面的羟基用作待合成核酸的合成起始点，通过共价键合连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体。在优选实施例中，核酸合成方法是固相亚磷酰胺三酯法。

本发明的一个实施例中提供一种核酸纯化装置，该装置包括固相载体，该固相载体包括可控孔径玻璃球 (CPG)，该 CPG 是未被修饰的裸 CPG，不带通用连接臂 (Universal Linker)，其表面具有羟基，这些羟基通过共价键合连接一段寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对。

本发明实施例中，CPG 表面的羟基与寡核苷酸序列的共价键合连接可以通过经典的固相亚磷酰胺三酯法实现，与现有技术不同的是，本发明实施例中采用的 CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面的羟基充当固相亚磷酰胺三酯法反应中 5'-羟基的作用与加入的亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体发生键合反应。

本发明实施例中，寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对，因此，能够有目的地对特异核酸序列进行纯化，在已知待纯化核酸的序列的情况下，容易根据碱基互补配对原则设计上述寡核苷酸序列。一般而言，寡核苷酸序列在待纯化核酸上的配对位置选在待纯化核酸的 3'端或/和 5'端的一段区域，具体而言，可以是待纯化核酸的 3'端的一段区域，也可以是待纯化核酸的 5'端的一段区域，还可以是在待纯化核酸的 3'端和 5'端各有一段区域。

一般而言，寡核苷酸序列的长度没有特别限制，可以根据具体需要设计任意长度，但是根据试验效果确定寡核苷酸序列的长度在 6 至 12 个碱基长度范围内能取得优异效果，例如 6 个碱基、8 个碱基、10 个碱基或 12 个碱基。

本发明实施例中，称为“核酸纯化装置”，意味着本发明的装置可以纯化任何合适的核酸，

包括但不限于 DNA 和 RNA 等。在本发明的优选实施例中，待纯化核酸是 DNA，因此，本发明的核酸纯化装置是一种 DNA 纯化装置。在更优选的实施例中，待纯化核酸是生物学反应产物，可以是任何生物学、生物化学等反应的产物，而该产物需要特异性纯化特定片段，这样的生物学反应产物典型但非限定性的例子是酶切产物或 PCR 产物等。

本发明实施例中，所采用的 CPG 球体内部有很多不规则的孔道，孔隙网络庞大，孔道的大小称为孔径，孔径稳定，通常选择孔径 500Å（埃）至 2000Å（优选 1000Å）的 CPG 用于本发明实施例的核酸纯化装置的制备，也可以选择其它孔径。在具体应用中，可以根据待纯化核酸的具体情况，来确定所采用的 CPG 的孔径。

本发明实施例中，核酸纯化装置可以设计成各种合适的形式。本发明提供两种示例性的形式。

在第一种形式中，核酸纯化装置包括 CPG 和筛板，筛板包括上筛板和下筛板，CPG 置于上筛板和下筛板之间，筛板可以采用超高分子量聚乙烯(UHMW-PE)或高密度聚乙烯(HDPE)等热塑性聚合物树脂粉末烧结而成。筛板的作用是阻挡 CPG 不漏下来而各种试剂能够通过。上筛板可以经过亲水处理或使用亲水材料，下筛板可以使用疏水材料。此外，该核酸纯化装置还包括容纳装置，CPG 等固相载体以及任选的筛板置于容纳装置中，该容纳装置可以是空柱管，该空柱管可以采用聚丙烯注塑而成。

在第二种形式中，核酸纯化装置包括 CPG 和热塑性聚合物树脂烧结形成的含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）作为固相载体。热塑性聚合物树脂可以选自聚乙烯或聚丙烯等，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。聚乙烯（PE）颗粒包裹并固定 CPG 颗粒，PE 颗粒之间搭桥形成一定的孔径，CPG 颗粒均匀地嵌入 PE 搭桥而成的刚性网状结构中，形成具有确定孔径和孔隙率的 CPG Frits。在该种形式中，CPG Frits 可以呈圆柱状，其直径可以是任何合适的直径，例如直径 $\leq 3.5\text{mm}$ ；厚度可以是任何合适的厚度，例如厚度 $\geq 1.5\text{mm}$ 。优选地，CPG Frits 的直径为 3mm，厚度为 4mm。此外，该核酸纯化装置还可以包括容纳装置，CPG Frits 等固相载体置于容纳装置中，该容纳装置可以是空柱管，该空柱管可以采用聚丙烯注塑而成。在一个优选实施例中，容纳装置是空柱管，固相载体 CPG Frits 制成圆柱状置于空柱管中，空柱管内预留至少一个装配位，装配位是圆柱体，没有斜度，固相载体呈圆柱状与空柱管完全切合，装配位的高度大于固相载体的厚度。

此外，本发明的核酸纯化装置中，容纳装置除了使用空柱管以外，还可以使用其他合适形式，例如多孔板，如 24 孔板、96 孔板、384 孔板等，每个 CPG Frits、或 CPG 和筛板分别置于多孔板的每个孔中，形成一种多孔板形式的核酸纯化装置，能够批量化进行核酸纯化。

如图 1、图 2 和图 4 所示，在本发明的一个示例性的实施例中，核酸纯化装置是核酸纯化柱，该核酸纯化柱包括：空柱管 1 和装配在空柱管内的 CPG Frits 2。其中，CPG 为不带通用连接臂（Universal Linker）、未被修饰的裸 CPG 载体，表面暴露有一定数量的羟基，CPG 的孔径为 1000Å。CPG Frits 2 由未被修饰的裸 CPG 颗粒 4 和热塑性聚合物树脂（例如 PE）烧结形成，PE 颗粒之间搭桥形成刚性网状结构 3。烧结温度可以是 160℃ 至 250℃，优选 180℃。烧结时间可以是 5 分钟至 10 小时等，具体可以根据需要确定。图 4 示出，裸 CPG 载体的表面暴露有一定数量的羟基（-OH），该羟基通过共价键合连接一段寡核苷酸序列，上述寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对。

在一个优选实施例中，CPG Frits 是 CPG 和 UHMW-PE 粉末混合均匀后于 180℃ 烧结而成，CPG Frits 的直径为 3mm，CPG Frits 的厚度为 4mm。CPG Frits 经过亲水处理，每颗 CPG Frits 中 CPG 的含量为 4mg。其中，CPG Frits 的亲水处理过程可以是先用醇类润湿，再键合上表面活性剂。其中，醇类溶剂可以是含 C1-10 直链或支链的醇类溶剂，优选甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、乙二醇、甘油、及它们的含水溶剂或它们的组合，更优选为 95%（v/v）的乙醇。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂，优选十二烷基硫酸钠、苯扎溴铵、聚山梨酯、脂肪酸山梨坦、季铵化物、卵磷脂、氨基酸或它们的组合。空柱管可以是聚丙烯注塑而成，采用梯度直口设计，预留的 CPG Frits 装配位是圆柱体，没有斜度。空柱管的柱长为 70mm，空柱管上部内径为 4.52mm，到装配位上部逐渐收口至 3mm，装配位的内径为 2.95mm，装配位的高度为 5mm。

本发明的一个实施例中提供一种核酸纯化设备，包括如本发明实施例的核酸纯化装置。

本发明的一个实施例中提供一种核酸纯化方法，该方法包括将含有待纯化核酸的溶液加入本发明的核酸纯化装置中孵育，使待纯化核酸与核酸纯化装置中的寡核苷酸序列特异性互补配对或随机配对结合；然后将待纯化核酸从核酸纯化装置上洗脱下来。

本发明实施例中，待纯化核酸可以是任何合适的核酸，包括但不限于 DNA 和 RNA 等。在本发明的优选实施例中，待纯化核酸是 DNA。在更优选的实施例中，待纯化核酸是生物学反应产物，可以是任何生物学、生物化学等反应的产物，而该产物需要特异性纯化特定片段，这样的生物学反应产物典型但非限定性的例子是酶切产物或 PCR 产物等。

本发明实施例中，待纯化核酸可以是含有至少一部分单链的核酸，包括但不限于待纯化核酸末端为突出的单链而中间为双链，或者待纯化核酸末端为双链，中间为单链，或者待纯化核酸整条链均为单链。在本发明的优选实施例中，待纯化核酸为单链核酸。

在本发明的一个优选实施例中，核酸纯化装置在与待纯化的溶液孵育之前，先进行氨解脱保护处理。氨解脱保护处理，例如，可以在 90℃ 下进行 2 小时；然后，使用乙腈/水溶液和超纯水为流动相进行洗涤，离心，得到连接有寡核苷酸序列的纯净的核酸纯化装置，之后再与待纯化的溶液孵育。

如图 5 所示，待纯化核酸是 PCR 产物，该 PCR 产物高温（例如 95℃）变性解旋形成单链，其中两端分别带有一段与核酸纯化装置中 CPG 表面连接的寡核苷酸序列互补的序列；将变性解旋的 PCR 产物上样至核酸纯化装置中孵育，CPG 表面连接的寡核苷酸序列与单链两端的序列区段互补；洗涤（例如，以乙醇/水溶液为流动相进行洗涤），除去未结合的 DNA 以及反应体系中的酶、缓冲液等杂质；然后将待纯化核酸从核酸纯化装置上洗脱下来，例如，在加热条件下，使配对结合的待纯化核酸和寡核苷酸序列变性解链，用加热超纯水将解开的单链待纯化核酸洗脱下来；最后将洗脱下来的核酸再次变性、退火，使互补单链恢复双螺旋结构，得到纯化的 DNA 产物。

本发明的一种实施例中提供本发明的核酸纯化装置在核酸纯化中的用途，其中，核酸纯化装置的 CPG 表面的羟基上连接一段寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对。

以下通过实施例详细说明本发明的技术方案，应当理解，实施例仅是示例性的，不能理解为对本发明保护范围的限制。

实施例

本实施例中，核酸纯化方法的具体实验过程和步骤如下：

（1）在 Dr. Oligo 192 核酸合成仪上采用经典的固相亚磷酰胺三酯法，利用亲水 DNA 合成柱（该合成柱内置 CPG Frits，其包括裸 CPG 载体，该裸 CPG 载体的表面暴露有一定数量的羟基）合成一段与待纯化 DNA 随机配对的纯化“钓饵”序列（即简并寡核苷酸序列），合成的简并寡核苷酸的序列长度分别为 6nt、8nt、10nt、12nt，并且连接在 CPG Frits 上，即获得所需的 DNA 纯化柱；

（2）对获得的 DNA 纯化柱在 90℃ 下进行 2 小时氨解脱保护处理后，依次以 400μL 乙腈/水（体积比 90:10）和 300μL 超纯水为流动相进行洗涤，离心，得到连接有纯净简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱；

（3）经 PCR 扩增获得含有大小为 350bp 目的片段的 DNA 产物溶液 25μL，于 95℃ 加热 5 分钟变性解旋为单链；

(4) 将步骤(3)中获得的变性 DNA 水溶液,快速上样至 DNA 纯化柱内,被 CPG Frits 吸收,于 25℃孵育 5 分钟与柱上寡核苷酸结合;

(5) 以 400 μ L 乙醇/水(体积比 80:20)为流动相洗涤 2 次,离心,除去未结合 DNA 等杂质;

(6) 于 95℃加热 5 分钟变性解链,用 20 μ L 95℃超纯水将解开的单链 DNA 洗脱下来,离心并收集;

(7) 将步骤(6)中获得的 DNA 水溶液再次于 95℃加热 5 分钟变性;

(8) 冷却至 60℃退火 10 分钟,获得纯净的 PCR 产物。

使用 NanoDrop 紫外分光光度计对纯化所得 PCR 产物进行检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.8-2.0。

如下表 1 为连接有不同长度寡核苷酸(均为简并碱基 N 的随机序列)的 DNA 纯化柱在相同条件下纯化 PCR 产物的纯化效果比较结果。

表 1

PCR 产物浓度 (ng/ μ L)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	简并寡核苷酸序 列长度(nt)	纯化后浓度 (ng/ μ L)	纯化后 OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
99.4	1.91	6	62.9	1.95
98.3	1.88	8	57.8	1.87
79.6	1.93	10	49.8	1.85
80.5	1.87	12	61.6	1.92

图 6 为上述实施例中纯化获得的 DNA 片段在 1.2%琼脂糖凝胶上的电泳结果图,其中,泳道 1 表示使用连接有 6nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物;泳道 2 表示使用连接有 8nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物;泳道 3 表示使用连接有 10nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物;泳道 4 表示使用连接有 12nt 简并寡核苷酸序列的 DNA 纯化柱回收 PCR 产物;M 表示 DL2000 DNA Marker。

从图 6 与表 1 结果可知,使用本发明的核酸合成装置连接简并寡核苷酸序列,基于该寡核苷酸序列与待纯化核酸的互补配对关系,可快速有效完成酶切、PCR 产物等的纯化工作,大大缩短纯化时间;所得到的 DNA 片段用紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值达 1.8-2.0,纯化得到的 DNA 产物纯度高,纯化回收率约为 50%。

以上应用了具体个例对本发明进行阐述，只是用于帮助理解本发明，并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员，依据本发明的思想，还可以做出若干简单推演、变形或替换。

权 利 要 求 书

1. 一种核酸合成装置，其特征在于，所述装置包括固相载体，所述固相载体包括可控孔径玻璃球（CPG），所述 CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面具有羟基，所述羟基可通过共价键连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体以进行核酸合成。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述核酸是 DNA，相应地，所述核酸合成装置是 DNA 合成装置。

3. 根据权利要求 1 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述 CPG 的孔径为 500Å（埃）至 2000Å。

4. 根据权利要求 1 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述核酸合成装置还包括筛板，所述筛板包括上筛板和下筛板，所述 CPG 置于所述上筛板和下筛板之间。

5. 根据权利要求 4 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述上筛板经过亲水处理或选自亲水材料，所述下筛板选自疏水材料。

6. 根据权利要求 1 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述固相载体还包括热塑性聚合物树脂，所述热塑性聚合物树脂与 CPG 烧结形成含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述热塑性聚合物树脂选自聚乙烯，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。

8. 根据权利要求 6 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述烧结的温度是 160℃至 250℃，优选 180℃。

9. 根据权利要求 6 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述 CPG Frits 的直径 $\leq 3.5\text{mm}$ ，厚度 $\geq 1.5\text{mm}$ 。

10. 根据权利要求 9 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述 CPG Frits 的直径为 3mm，厚度为 4mm。

11. 根据权利要求 6 所述的核酸合成装置，其特征在于，每个所述 CPG Frits 含有 0.1-10mg CPG，优选 4mg CPG。

12. 根据权利要求 6 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述 CPG Frits 是亲水性的 CPG Frits。

13. 根据权利要求 12 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述亲水性的 CPG Frits 是通过亲水处理获得的 CPG Frits。

14. 根据权利要求 13 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述亲水处理是先用醇类溶剂润湿，再键合上表面活性剂。

15. 根据权利要求 14 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述醇类溶剂为含 C1-10 直链或支链的醇类溶剂，优选为甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、乙二醇、甘油、及它们的含水溶剂或它们的组合，更优选为 95% (v/v) 的乙醇；

所述表面活性剂为阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂，优选为十二烷基硫酸钠、苯扎溴铵、聚山梨酯、脂肪酸山梨坦、季铵化物、卵磷脂、氨基酸或它们的组合。

16. 根据权利要求 1 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述核酸合成装置还包括容纳装置，所述固相载体置于所述容纳装置中。

17. 根据权利要求 16 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述容纳装置是空柱管。

18. 根据权利要求 17 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述空柱管内预留至少一个装配位，所述装配位是圆柱体，所述固相载体呈圆柱状，使所述固相载体与所述装配位完全切合，所述装配位的高度大于所述固相载体的厚度。

19. 根据权利要求 18 所述的核酸合成装置，其特征在于，所述空柱管的柱长为 70 mm，空柱管上部内径为 4.52mm，到所述装配位上部逐渐收口至 3mm，所述装配位的内径为 2.95mm，所述装配位的高度为 5mm。

20. 一种核酸合成设备，其特征在于，所述设备包括如权利要求 1-19 任一项所述的核酸合成装置。

21. 权利要求 1-19 任一项所述的核酸合成装置在核酸合成中的用途。

22. 根据权利要求 21 所述的用途，其特征在于，使用固相亚磷酰胺三酯法进行所述核酸合成。

23. 一种核酸合成方法，其特征在于，所述方法包括使用权利要求 1-19 任一项所述的核酸合成装置或权利要求 20 所述的核酸合成设备进行核酸合成，所述核酸合成装置中 CPG 表面的羟基用作待合成核酸的合成起始点，通过共价键合连接亚磷酰胺保护的核苷酸单体或多聚体。

24. 根据权利要求 23 所述的核酸合成方法，其特征在于，所述方法是固相亚磷酰胺三酯法。

25. 一种核酸纯化装置，其特征在于，所述装置包括固相载体，所述固相载体包括可控孔径玻璃球（CPG），所述 CPG 是未被修饰的裸 CPG，其表面具有羟基，所述羟基通过共价键合连接一段寡核苷酸序列，所述寡核苷酸序列与待纯化核酸全部或部分特异性互补配对或随机配对。

26. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述寡核苷酸序列与待纯化核酸的 3'端或/和 5'端的一段区域全部或部分特异性互补配对或随机配对。

27. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述寡核苷酸序列的长度是 6 至 12 个碱基长度。

28. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述待纯化核酸是 DNA，相应地，所述核酸纯化装置是 DNA 纯化装置。

29. 根据权利要求 28 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述待纯化核酸是生物学反应产物，优选酶切产物或 PCR 产物。

30. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述 CPG 的孔径为 500Å（埃）至 2000Å。

31. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述核酸纯化装置还包括筛板，所述筛板包括上筛板和下筛板，所述 CPG 置于所述上筛板和下筛板之间。

32. 根据权利要求 31 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述上筛板经过亲水处理或选自亲水材料，所述下筛板选自疏水材料。

33. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述固相载体还包括热塑性聚合物树脂，所述热塑性聚合物树脂与 CPG 烧结形成含可控孔径玻璃球的滤芯（CPG Frits）。

34. 根据权利要求 33 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述热塑性聚合物树脂选自聚乙烯，优选超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）或高密度聚乙烯（HDPE）。

35. 根据权利要求 34 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述 CPG Frits 的直径 $\leq 3.5\text{mm}$ ，厚度 $\geq 1.5\text{mm}$ 。

36. 根据权利要求 25 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述核酸纯化装置还包括容纳装置，所述固相载体置于所述容纳装置中。

37. 根据权利要求 36 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述容纳装置是空柱管。

38. 根据权利要求 37 所述的核酸纯化装置，其特征在于，所述空柱管内预留至少一个装

配位，所述装配位是圆柱体，所述固相载体呈圆柱状，使所述固相载体与所述装配位完全切合，所述装配位的高度大于所述固相载体的厚度。

39. 一种核酸纯化设备，其特征在于，所述设备包括如权利要求 25-38 任一项所述的核酸纯化装置。

40. 一种核酸纯化方法，其特征在于，所述方法包括将含有待纯化核酸的溶液加入如权利要求 25-38 任一项所述的核酸纯化装置中孵育，使所述待纯化核酸与所述核酸纯化装置中的所述寡核苷酸序列全部或部分特异性互补配对或随机配对结合；然后将所述待纯化核酸从所述核酸纯化装置上洗脱下来。

41. 根据权利要求 40 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述待纯化核酸为单链核酸。

42. 根据权利要求 40 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述核酸纯化装置在与所述溶液孵育之前，先进行氨解脱保护处理。

43. 根据权利要求 42 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述氨解脱保护处理在 90℃ 下进行 2 小时；然后，使用乙腈/水溶液和超纯水为流动相进行洗涤，离心，得到连接有所述寡核苷酸序列的核酸纯化装置后再与所述溶液孵育。

44. 根据权利要求 40 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述孵育之后，以乙醇/水溶液为流动相进行洗涤，除去未结合的核酸和/或酶和/或缓冲液，之后再将所述待纯化核酸从所述核酸纯化装置上洗脱下来。

45. 根据权利要求 40 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述将所述待纯化核酸从所述核酸纯化装置上洗脱下来，具体包括：在加热条件下，使配对结合的待纯化核酸和寡核苷酸序列变性解链，用加热超纯水将解开的单链待纯化核酸洗脱下来。

46. 根据权利要求 40 所述的核酸纯化方法，其特征在于，所述待纯化核酸从所述核酸纯化装置上洗脱下来后再进行退火，使互补单链恢复双螺旋结构。

47. 权利要求 25-38 任一项所述的核酸纯化装置在核酸纯化中的用途。

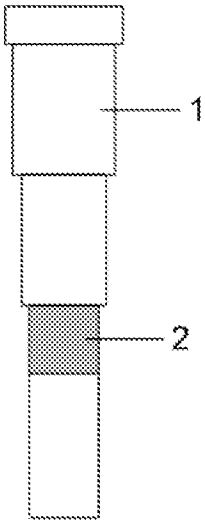


图 1

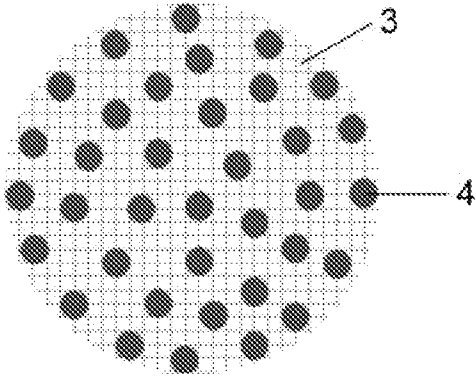


图 2

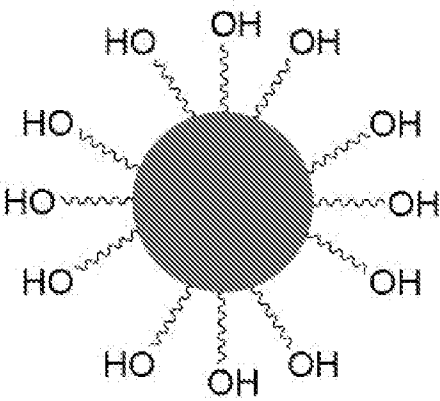


图 3

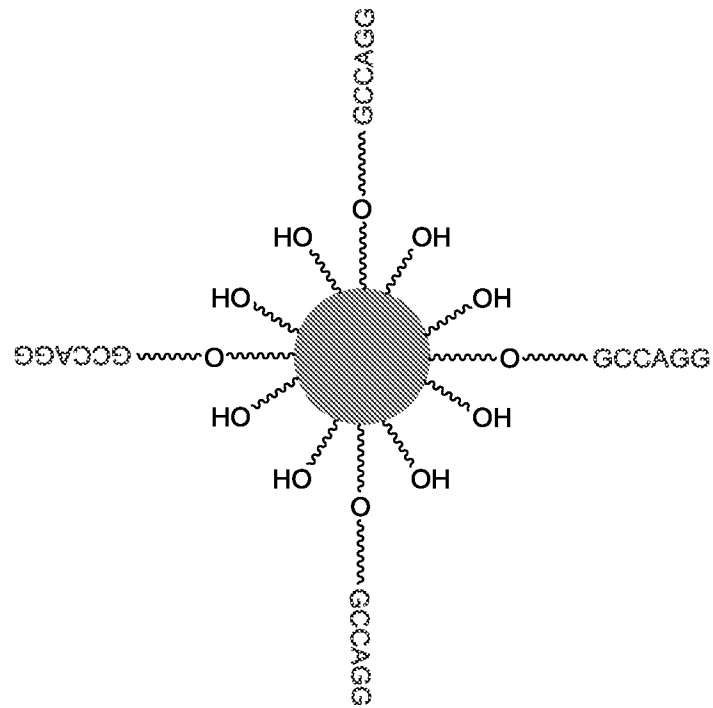


图 4

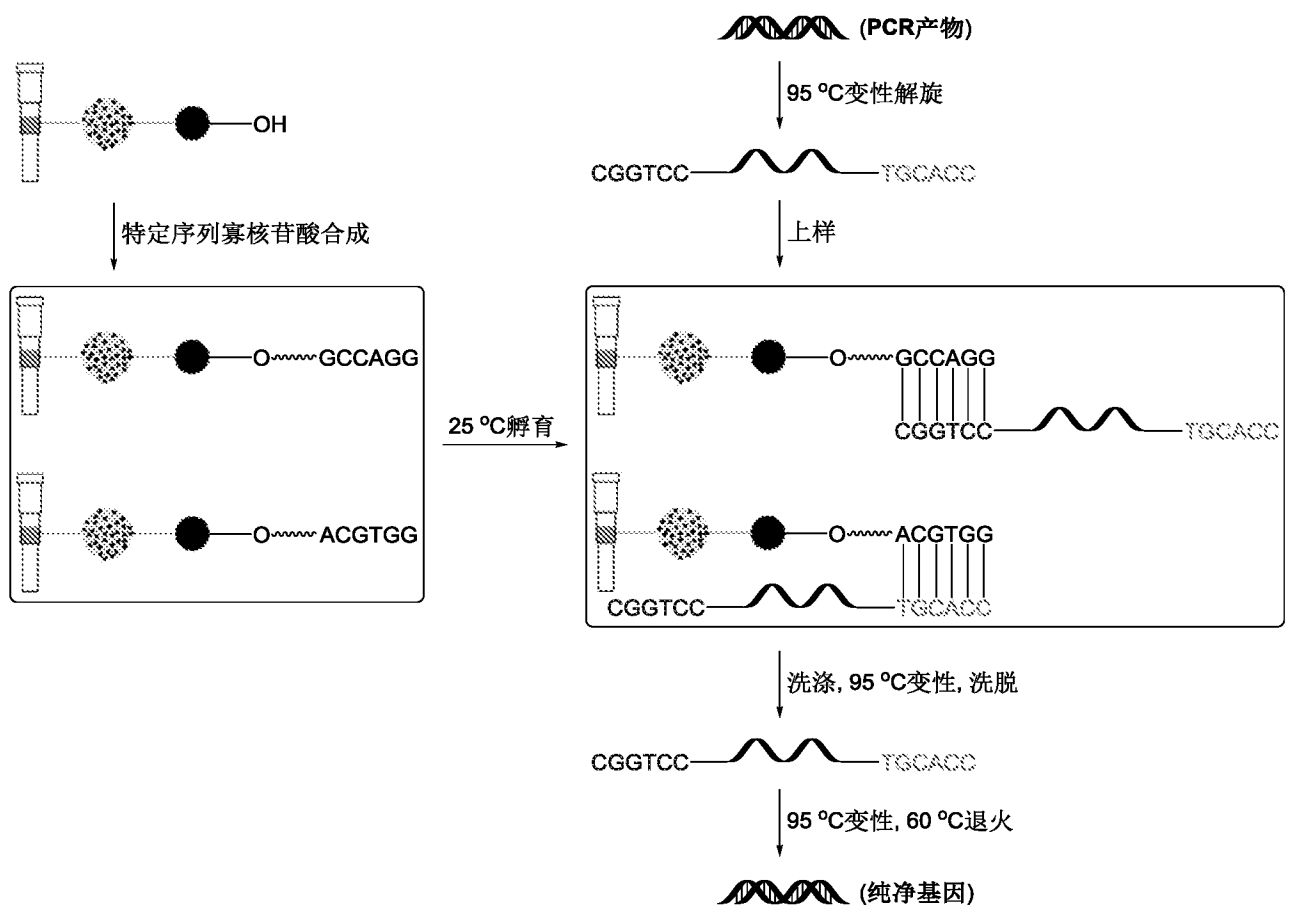


图 5

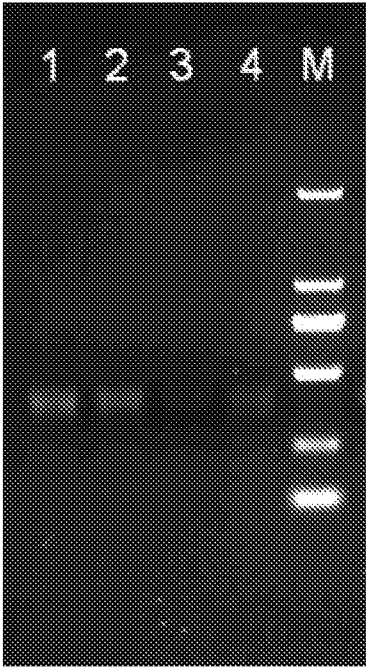


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/121092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/34(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/40(2006.01)i; C12N 15/10(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)

C12P C12M C12N

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; CNTXT; CJFD; CNKI; DWPI; SIPOABS; WOTXT; USTXT; EPTXT; 万方; WANFANG; 读秀; DUXIU; ISI Web of Science; 深圳华大生命科学研究院, 方鑫, 黄小罗, 沈明, 徐讯, 核酸, DNA, 合成, 纯化, 固相载体, 可控孔径玻璃球, CPG, 滤芯, 修饰, 羟基, 连接臂, BGI SHENZHEN, nucleic acid, Synthesis, purification, Solid-phase, Controlled pore glass, frits, modification, hydroxyl, linker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 204151332 U (BIOCOMMA LIMITED) 11 February 2015 (2015-02-11) description, paragraphs [0003]-[0008] and [0050]-[0056]	1-47
A	EP 3284851 A1 (HITGEN LTD.) 21 February 2018 (2018-02-21) entire document	1-47
A	CN 207483713 U (SHENZHEN BM LIFE SCIENCE CO., LTD.) 12 June 2018 (2018-06-12) entire document	1-47
A	CN 107383246 A (YANCHENG TEACHERS UNIVERSITY) 24 November 2017 (2017-11-24) entire document	1-47



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

03 August 2019

Date of mailing of the international search report

29 August 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/121092

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	204151332	U	11 February 2015	None			
EP	3284851	A1	21 February 2018	US	2018155710	A1	07 June 2018
				JP	2018512438	A	17 May 2018
				EP	3284851	A4	05 December 2018
				WO	2016165621	A1	20 October 2016
CN	207483713	U	12 June 2018	None			
CN	107383246	A	24 November 2017	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/121092

A. 主题的分类 C12P 19/34(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/40(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i 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) C12P C12M C12N 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)) CNABS;CNTXT;CJFD;CNKI;DWPI;SIPOABS;WOTXT;USTXT;EPTXT;万方;读秀;ISI Web of Science; 深圳华大生命科学研究院, 方鑫, 黄小罗, 沈玥, 徐讯, 核酸, DNA, 合成, 纯化, 固相载体, 可控孔径玻璃球, CPG, 滤芯, 修饰, 羟基, 连接臂, BGI SHENZHEN, nucleic acid, Synthesis, purification, Solid-phase, Controlled pore glass, frits, modification, hydroxyl, linker																	
C. 相关文件 <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>A</td> <td>CN 204151332 U (深圳逗点生物技术有限公司) 2015年 2月 11日 (2015 - 02 - 11) 说明书第[0003]-[0008]、[0050]-[0056]段</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 3284851 A1 (HITGEN LTD.) 2018年 2月 21日 (2018 - 02 - 21) 全文</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 207483713 U (深圳市百迈生命科学有限公司) 2018年 6月 12日 (2018 - 06 - 12) 全文</td> <td>1-47</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107383246 A (盐城师范学院) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 全文</td> <td>1-47</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	A	CN 204151332 U (深圳逗点生物技术有限公司) 2015年 2月 11日 (2015 - 02 - 11) 说明书第[0003]-[0008]、[0050]-[0056]段	1-47	A	EP 3284851 A1 (HITGEN LTD.) 2018年 2月 21日 (2018 - 02 - 21) 全文	1-47	A	CN 207483713 U (深圳市百迈生命科学有限公司) 2018年 6月 12日 (2018 - 06 - 12) 全文	1-47	A	CN 107383246 A (盐城师范学院) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 全文	1-47
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 204151332 U (深圳逗点生物技术有限公司) 2015年 2月 11日 (2015 - 02 - 11) 说明书第[0003]-[0008]、[0050]-[0056]段	1-47															
A	EP 3284851 A1 (HITGEN LTD.) 2018年 2月 21日 (2018 - 02 - 21) 全文	1-47															
A	CN 207483713 U (深圳市百迈生命科学有限公司) 2018年 6月 12日 (2018 - 06 - 12) 全文	1-47															
A	CN 107383246 A (盐城师范学院) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 全文	1-47															
☐ 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 2019年 8月 3日		国际检索报告邮寄日期 2019年 8月 29日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451		受权官员 姜岚 电话号码 (86-512)88996515															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/121092

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	204151332	U	2015年 2月 11日	无	
EP	3284851	A1	2018年 2月 21日	US 2018155710 A1	2018年 6月 7日
				JP 2018512438 A	2018年 5月 17日
				EP 3284851 A4	2018年 12月 5日
				WO 2016165621 A1	2016年 10月 20日
CN	207483713	U	2018年 6月 12日	无	
CN	107383246	A	2017年 11月 24日	无	