

(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
2024年5月10日 (10.05.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/093150 A1

(51) 国际专利分类号:
B01D 15/08 (2006.01) **B01D 15/42** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/088237

(22) 国际申请日: 2023年4月14日 (14.04.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211364952.2 2022年11月3日 (03.11.2022) CN

(71) 申请人: 百力格生物科技(上海)股份有限公司 (**BIOLIGO BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD**) [CN/CN]; 中国上海市松江区书海路99号23幢, Shanghai 201611 (CN)。

(72) 发明人: 蔡晶晶 (**CAI, Jingjing**); 中国上海市奉贤区南桥镇文怡花园23幢64号402室, Shanghai 201401 (CN)。

(74) 代理人: 上海愉腾专利代理事务所(普通合伙) (**SHANGHAI YUTENG PATENT AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)**); 中国上海市徐汇区漕宝路509号9幢401-31室, Shanghai 200233 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(54) **Title:** METHOD FOR PURIFYING DYE-MODIFIED NUCLEIC ACID PROBE

(54) 发明名称: 染料修饰后的核酸探针纯化方法

(57) **Abstract:** A method for purifying a dye-modified nucleic acid probe. By means of the acting force between an adsorbent and the non-polar functional groups of a free modification dye and a dye-modified nucleic acid probe, the excess free modification dye and the dye-modified nucleic acid probe are retained on an adsorbent, then a column containing the adsorbent is eluted with an aqueous solution containing an organic solvent, and the dye-modified nucleic acid probe is selectively eluted from the adsorbent using the polarity difference between the free modification dye and the dye-modified nucleic acid probe. This method does not require the pre-cooling of a reagent and has a simple process flow; and the operation time for removing the free modification dye is shortened from 4-15 h to 10-20 min, which greatly shortens the operation cycle.

(57) 摘要: 一种染料修饰后的核酸探针纯化方法, 通过吸附剂与游离修饰染料和染料修饰后的核酸探针的非极性官能团之间的作用力, 将过量的游离修饰染料和所述染料修饰后的核酸探针保留在吸附剂上, 然后用含有机溶剂的水溶液洗脱含吸附剂的柱子, 利用所述游离修饰染料与所述染料修饰后的核酸探针之间的极性差异, 将所述染料修饰后的核酸探针选择性地从吸附剂上洗脱下来。该方法不需要预冷试剂, 工艺流程简单; 去除游离修饰染料的操作过程时间由4-15小时缩短为10-20分钟, 极大的缩短了操作周期。



WO 2024/093150 A1

说明书

发明名称：染料修饰后的核酸探针纯化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸合成领域，特别涉及一种染料修饰后的核酸探针纯化方法。

背景技术

[0002] 单链DNA与RNA是由一定数量的脱氧核苷酸或者核苷酸组合而成。而对DNA或者RNA的结构进行一些修饰染料标记，就形成了DNA修饰探针以及RNA修饰探针。DNA/RNA修饰探针广泛应用在分子诊断QPCR（实时荧光定量）、STR（短串联重复序列）、以及FISH（荧光原位杂交技术）等领域。

[0003] 一般地，有两种常见的方法可用于单链DNA核酸与RNA核酸的修饰染料标记。一种为固相亚磷酰胺三酯法，另一种为液相氨基活化酯加成法。传统的液相氨基活化酯加成法是把含有氨基活性基团的DNA/RNA核酸探针溶解在碱性的缓冲液中，然后加入3倍摩尔量的有机溶剂溶解的活化酯修饰染料，在常温反应4-12小时。为了除掉反应中过量的游离修饰染料，反应完成后需要使用乙醇沉淀法对DNA/RNA修饰探针进行沉淀，同时用70%的冰冻乙醇对沉淀物进行洗涤，得到沉淀固体。

[0004] 在现有技术中，反应完成后体系中含有过量的游离修饰染料以及缓冲盐，针对特定应用领域，这些未反应的游离修饰染料及缓冲盐需要在后续生产中提前去除，故在反应后处理中，需要大量使用有机溶剂反复进行沉淀清洗，产生较多有害废液，同时针对大规格的DNA/RNA修饰探针，处理时间长达4-15小时，极大浪费时间。沉淀洗涤过程中使用的乙醇试剂需要-20℃预冷，工艺要求高，过程繁琐。

[0005] 同时，乙醇沉淀法不能完全沉淀DNA/RNA修饰探针，过程损失较大，一般沉淀损失率约为3-10%。另外在处理过程中需要大量使用有机溶剂反复进行沉淀清洗，材料成本浪费太高。对于大规格的DNA/RNA核酸探针来说，因游离修饰染料与核酸大分子结构相互包裹，即便经过多次沉淀清洗，在经过高效液相色谱仪纯化后，产品中仍会残留少量游离修饰染料，对于STR等类型的探针，少量或微量

残留的游离修饰染料会影响到结果的解读。

发明内容

- [0006] 为了解决上述技术问题，发明了一种染料修饰后的核酸探针纯化方法，所述方法通过吸附剂与游离修饰染料和染料修饰后的核酸探针的非极性官能团之间的作用力，将过量的游离修饰染料和所述染料修饰后的核酸探针保留在吸附剂上，然后用含有机溶剂的水溶液洗脱含吸附剂的柱子，利用所述游离修饰染料与所述染料修饰后的核酸探针之间的极性差异，将所述染料修饰后的核酸探针选择性地从吸附剂上洗脱下来，而所述游离修饰染料保留在吸附剂上，以纯化所述染料修饰后的核酸探针；所述吸附剂是C18吸附柱，所述含有机溶剂的水溶液中乙腈所占体积是5-15%。
- [0007] 本发明中核酸探针的修饰染料是在荧光探针中使用的染料，诸如CY7 SE(花菁素7琥珀酰亚胺活化酯)、CY5 SE(花菁素5琥珀酰亚胺活化酯)、CY5.5 SE(花菁素5.5琥珀酰亚胺活化酯)、CY3 SE(花菁素3琥珀酰亚胺活化酯)、TAMRA SE(简写TAM)(羟基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺活化酯)、ROX SE(6-羟基-X-罗丹明琥珀酰亚胺活化酯)、TexasRed SE(简写TXR)(德克萨斯红琥珀酰亚胺活化酯)。
- [0008] 在一种实施方式中，所述含有机溶剂的水溶液中乙腈所占体积是10%。
- [0009] 在一种实施方式中，用所述含有机溶剂的水溶液洗脱二次。
- [0010] 在一种实施方式中，所述染料是ROX、TXR、TAM、CY3、CY5、CY5.5或CY7。
- [0011] 在一种实施方式中，所述核酸探针是DNA核酸探针或RNA核酸探针。本发明提供了一种在染料修饰后的核酸探针中快速去除游离修饰染料的方法，该方法不需要预冷试剂，工艺流程简单；该方法的操作过程时间由4-15小时缩短为10-20分钟，极大的缩短了操作周期；该方法对DNA/RNA核酸探针的保留性高，过程损失非常小，一般损失率约为1-4%；该方法解决了在高效液相色谱仪纯化后游离修饰染料在DNA/RNA核酸探针中残留的问题，提高了产品纯度。该方法只需加入少量的有机溶剂洗脱，极大的降低有害废液的产生。
- [0012] 具体实施方式
- [0013] 为了使本领域的技术领域人员更好地理解本申请中的技术方案，下面将结合实

施例对本发明作进一步说明，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域的普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例，都应当属于本申请保护的范畴。下述实施例中，如无特殊说明，均为本领域常规方法。

[0014] 实施例一 不同吸附剂的选择实验

[0015] 本实验对吸附剂的种类进行筛选，选择两种吸附剂八烷基硅烷键合硅胶填料（C8）、十八烷基硅烷键合硅胶填料（C18），分别装在有筛板的塑料柱管中，制成C8吸附柱和C18吸附柱。使用这两种吸附柱在相同的实验条件下分别对染料修饰后的核酸探针和游离修饰染料的吸附效果进行比较。因游离修饰染料的最大吸收波长与染料修饰核酸探针的染料最大吸收波长一致，在高效液相色谱上，选择修饰染料的最大吸收波长作为检测波长，对比原液与回收溶液中游离修饰染料的峰面积占比，来表征游离修饰染料的吸附程度。用酶标仪测量溶液中核酸探针的吸光值再转换成nmol值，计算核酸探针含量。

[0016] 具体实验方案如下：

[0017] 1. 将400nmol含有氨基结构的DNA/RNA核酸探针溶解于400u1 pH为8.5

[0018] 的0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液中，充分震荡混匀；

[0019] 2. 用150u1 DMF溶剂去溶解1200nmol活化酯修饰染料固体，并加入至上述缓冲液中，充分震荡混匀；

[0020] 3. 将上述混合溶液放入摇床，震荡4-12小时；

[0021] 4. 取4nmol对应的粗品体积，在高效液相色谱上分析，计算染料最大吸收波长下的游离染料峰面积的占比；

[0022] 5. 分别在C8吸附柱与C18吸附柱中加入10ml甲醇溶液，静置5min后缓慢滴下，弃废液

[0023] 6. 分别在C8吸附柱与C18吸附柱中加入10ml超纯水，缓慢滴下，弃废液；

[0024] 7. 分别在C8吸附柱与C18吸附柱的下端口放置10ml离心管；

[0025] 8. 将步骤（3）所述溶液均分为2份，分别倒入C8与C18吸附柱中，缓慢滴下，收集回收溶液；

[0026] 9. 用酶标仪测量回收溶液的吸光值，计算回收溶液中修饰探针的nmol含量。

[0027] 10. 取4nmol对应的回收溶液体积，在高效液相色谱上分析，计算修饰染料最大吸收波长下的游离修饰染料峰面积的占比；

[0028] 11. 表中碱基数即指DNA/RNA中脱氧核苷酸或核苷酸的个数。核酸探针的在不同吸附柱上的吸附率数据如表1所示，游离染料在不同吸附柱上的吸附量数据如表2所示，各个样品核酸序列如表3所示，数据的计算

[0029] 公式如下：

[0030] 核酸探针吸附率=（核酸探针的投料量-回收溶液中核酸探针的含量）/核酸探针的投料量。

[0031] 表1

[0032]

样品编号	碱基数	修饰探针投料量/nmol	溶液中修饰探针含量/nmol		修饰探针吸附率	
			C8 吸附柱	C18 吸附柱	C8 吸附柱	C18 吸附柱
TEOS10-DNA-RDX-1	20	198	10	7	95%	96%
TEOS10-DNA-RDX-2	53	198	56	8	72%	96%
TEOS10-DNA-CYS-1	20	198	11	8	94%	96%
TEOS10-DNA-CYS-2	53	198	73	7	63%	96%
TEOS10-RNA-RDX-1	20	198	23	8	88%	96%
TEOS10-RNA-RDX-2	46	198	56	7	72%	96%
TEOS10-RNA-CYS-1	20	198	21	8	89%	96%
TEOS10-RNA-CYS-2	46	198	53	6	73%	97%

[0033] 表2

[0034]

样品编号	碱基数	溶液中游离染料的峰面积占比			
		原液	C8 吸附回收液	C18 吸附回收液	游离染料峰面积占比要求
TE0510-DNA-ROX-1	20	39.15%	2.21%	1.43%	≤5%
TE0510-DNA-ROX-2	53	46.13%	2.53%	2.24%	≤5%
TE0510-DNA-CYS-1	20	38.25%	2.13%	1.33%	≤5%
TE0510-DNA-CYS-2	53	46.12%	3.25%	2.52%	≤5%
TE0510-RNA-ROX-1	20	41.56%	4.53%	2.43%	≤5%
TE0510-RNA-ROX-2	46	46.44%	2.33%	2.26%	≤5%
TE0510-RNA-CYS-1	20	37.24%	3.42%	2.14%	≤5%
TE0510-RNA-CYS-2	46	44.53%	3.43%	2.43%	≤5%

[0035] 表3

样品编号	序列
TE0510-DNA-ROX-1	/5ROX/5TGCTAGCTAGATGGGTTAT
TE0510-DNA-ROX-2	/5ROX/5ATGGTGTAGCTAGATGGGTTATAGCTACGGTAGCATGCTAGTACGGTAGCTA
TE0510-DNA-CYS-1	/5CYS/5TGCTAGCTAGATGGGTTAT
TE0510-DNA-CYS-2	/5CYS/5ATGGTGTAGCTAGATGGGTTATAGCTACGGTAGCATGCTAGTACGGTAGCTA
TE0510-RNA-ROX-1	/5ROX/rArCrCrUrGcUrCrArCrArUrUrCrArCrGcCrUrArG
TE0510-RNA-ROX-2	/5ROX/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArCrUrUrArCrArUrUrArCrArUrUrArCrArArCrArArGrUrC
TE0510-RNA-CYS-1	/5CYS/rArCrCrUrGcUrCrArCrArUrUrCrArCrGcCrUrArG
TE0510-RNA-CYS-2	/5CYS/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArCrUrUrArCrArUrUrArCrArUrUrArCrArUrUrArCrArArCrArArGrUrC

[0037] 结论：从表1可以看出，C8吸附剂对于短链核酸探针吸附效果尚可，但对于长链核酸探针吸附效果较差；C18吸附剂对于短链、长链核酸探针的吸附效果都比C8吸附剂好，修饰探针吸附率都在95%以上。从表2可以看出，使用C8吸附剂和C18吸附剂吸附，回收液中游离修饰染料的峰面积占比偏差不大，且占比均低于5%，达到预期要求；且相应的C18比C8溶液中游离染料的峰面积占比明显小。综合数据考虑，C18吸附剂为最优选项。

[0038] 实施例二 不同洗脱剂的选择实验

[0039] 本实施例对洗脱剂的类型进行筛选，考虑到DNA/RNA核酸探针在有机溶剂中的溶解性，实验使用的洗脱剂均为80%有机溶剂+20%超纯水（体积比）的比例液。

在相同的实验条件下分别对染料修饰后的核酸探针和游离修饰染料的洗脱效果进行比较。在高效液相色谱上，仍选择修饰染料的最大吸收波长作为检测波长，对比原液与回收溶液中游离修饰染料的峰面积占比，来表征游离修饰染料的残留程度。用酶标仪测量溶液中核酸探针的吸光值再转换成nmol值，计算核酸探针含量。

[0040] 具体操作如下：

[0041] 1. 将800nmol含有氨基结构的DNA/RNA核酸探针溶解于800u1 pH为8.5的0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液中，充分震荡混匀；

[0042] 2. 用300u1 DMF溶剂去溶解2400nmol活化酯修饰染料固体，并加入至上述缓冲液中，充分震荡混匀；

[0043] 3. 将上述混合溶液放入摇床，震荡4-12小时；

[0044] 4. 取4nmol对应的粗品体积，在高效液相色谱上分析，计算染料最大吸收波长下的游离染料峰面积的占比；

[0045] 5. 在C18吸附柱中加入10ml甲醇溶液，静置5min后缓慢滴下，弃废液；

[0046] 6. 在C18吸附柱中加入10ml超纯水，缓慢滴下，弃废液；

[0047] 7. 将步骤（3）所述溶液均分为4份，分别倒入4个C18吸附柱中，缓慢滴下，弃废液；

[0048] 8. 在4个C18吸附柱的下端口分别放置10ml离心管；

[0049] 9. 在4个C18吸附柱中分别加入8ml的80%甲醇、80%乙腈、80%乙醇、80%丙醇溶液，缓慢滴下，收集回收溶液

[0050] 10. 测量回收溶液的吸光值，计算回收溶液中修饰探针的nmol含量。

[0051] 11. 取4nmol对应的回收溶液体积，在高效液相色谱上分析，计算修饰染料最大吸收波长下的游离修饰染料峰面积的占比；

[0052] 12. 表中碱基数即指DNA/RNA中脱氧核苷酸或核苷酸的个数。核酸探针的回收率数据如表4所示，游离染料的峰面积占比数据如表5所示，各个样品核酸序列如表6所示，数据的计算公式如下：

[0053] 核酸探针回收率=回收溶液中核酸探针的含量/核酸探针的投料量

[0054] 表4

[0055]

样品编号	碱基数	修饰探针投料量/ nmol	回收溶液中修饰探针 的含量/nmol	修饰探针回收率
TEOS12-DNA-R0X-1-80%甲醇	20	199	142	66%
TEOS12-DNA-R0X-1-80%乙醇	20	199	162	81%
TEOS12-DNA-R0X-1-80%乙醇	20	199	163	82%
TEOS12-DNA-R0X-1-80%丙醇	20	199	168	84%
TEOS12-DNA-CY5-1-80%甲醇	20	199	131	67%
TEOS12-DNA-CY5-1-80%乙醇	20	199	159	80%
TEOS12-DNA-CY5-1-80%乙醇	20	199	161	82%
TEOS12-DNA-CY5-1-80%丙醇	20	199	165	83%
TEOS12-DNA-R0X-2-80%甲醇	53	199	141	72%
TEOS12-DNA-R0X-2-80%乙醇	53	199	165	83%
TEOS12-DNA-R0X-2-80%乙醇	53	199	164	82%
TEOS12-DNA-R0X-2-80%丙醇	53	199	164	82%
TEOS12-DNA-CY5-2-80%甲醇	53	199	142	66%
TEOS12-DNA-CY5-2-80%乙醇	53	199	159	80%
TEOS12-DNA-CY5-2-80%乙醇	53	199	163	82%
TEOS12-DNA-CY5-2-80%丙醇	53	199	164	82%
TEOS12-RNA-R0X-1-80%甲醇	20	199	129	65%
TEOS12-RNA-R0X-1-80%乙醇	20	199	165	83%
TEOS12-RNA-R0X-1-80%乙醇	20	199	169	85%
TEOS12-RNA-R0X-1-80%丙醇	20	199	166	83%
TEOS12-RNA-CY5-1-80%甲醇	20	199	135	68%
TEOS12-RNA-CY5-1-80%乙醇	20	199	159	80%
TEOS12-RNA-CY5-1-80%乙醇	20	199	166	84%
TEOS12-RNA-CY5-1-80%丙醇	20	199	167	84%
TEOS12-RNA-R0X-2-80%甲醇	48	199	142	66%
TEOS12-RNA-R0X-2-80%乙醇	48	199	155	78%
TEOS12-RNA-R0X-2-80%乙醇	48	199	168	83%
TEOS12-RNA-R0X-2-80%丙醇	48	199	166	83%
TEOS12-RNA-CY5-2-80%甲醇	48	199	139	70%
TEOS12-RNA-CY5-2-80%乙醇	48	199	158	79%
TEOS12-RNA-CY5-2-80%乙醇	48	199	165	83%
TEOS12-RNA-CY5-2-80%丙醇	48	199	167	84%

[0056]

表5

[0057]

样品编号	碱基数	溶液中游离染料的峰面积占比		
		原液	回收液	游离染料峰面积占比要求
TE0512-DNA-ROX-1-80%甲醇	20	40.34%	16.33%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-1-80%乙腈	20	40.34%	17.23%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-1-80%乙醇	20	40.34%	28.45%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-1-80%丙醇	20	40.34%	31.12%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-1-80%甲醇	20	45.25%	20.12%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-1-80%乙腈	20	45.25%	21.32%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-1-80%乙醇	20	45.25%	33.14%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-1-80%丙醇	20	45.25%	36.09%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-2-80%甲醇	53	38.77%	14.12%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-2-80%乙腈	53	38.77%	15.08%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-2-80%乙醇	53	38.77%	25.21%	≤5%
TE0512-DNA-ROX-2-80%丙醇	53	38.77%	27.32%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-2-80%甲醇	53	46.62%	19.42%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-2-80%乙腈	53	46.62%	21.06%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-2-80%乙醇	53	46.62%	32.21%	≤5%
TE0512-DNA-CY5-2-80%丙醇	53	46.62%	33.01%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-1-80%甲醇	20	41.55%	11.02%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-1-80%乙腈	20	41.55%	11.07%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-1-80%乙醇	20	41.55%	25.23%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-1-80%丙醇	20	41.55%	23.32%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-1-80%甲醇	20	46.73%	12.21%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-1-80%乙腈	20	46.73%	15.14%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-1-80%乙醇	20	46.73%	28.14%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-1-80%丙醇	20	46.73%	32.31%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-2-80%甲醇	48	37.43%	12.04%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-2-80%乙腈	48	37.43%	13.05%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-2-80%乙醇	48	37.43%	23.12%	≤5%
TE0512-RNA-ROX-2-80%丙醇	48	37.43%	25.65%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-2-80%甲醇	48	43.22%	15.14%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-2-80%乙腈	48	43.22%	18.12%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-2-80%乙醇	48	43.22%	28.43%	≤5%
TE0512-RNA-CY5-2-80%丙醇	48	43.22%	29.04%	≤5%

[0058]

表6

[0059]

样品编号	序列
TE0512-DNA-ROX-1-80%甲醇	/5ROX/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-ROX-1-80%乙腈	/5ROX/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-ROX-1-80%乙醇	/5ROX/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-ROX-1-80%丙醇	/5ROX/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-CY5-1-80%甲醇	/5CY5/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-CY5-1-80%乙腈	/5CY5/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-CY5-1-80%乙醇	/5CY5/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-CY5-1-80%丙醇	/5CY5/CGCCTGGTCACCAGGGCTGC
TE0512-DNA-ROX-2-80%甲醇	/5ROX/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-ROX-2-80%乙腈	/5ROX/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-ROX-2-80%乙醇	/5ROX/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-ROX-2-80%丙醇	/5ROX/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-CY5-2-80%甲醇	/5CY5/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-CY5-2-80%乙腈	/5CY5/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-CY5-2-80%乙醇	/5CY5/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-DNA-CY5-2-80%丙醇	/5CY5/AAACGGGTAACGCACCACACTGGACTTGCCGAACGCACCAGGGA
TE0512-RNA-ROX-1-80%甲醇	/5ROX/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-ROX-1-80%乙腈	/5ROX/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-ROX-1-80%乙醇	/5ROX/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-ROX-1-80%丙醇	/5ROX/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-CY5-1-80%甲醇	/5CY5/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-CY5-1-80%乙腈	/5CY5/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-CY5-1-80%乙醇	/5CY5/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-CY5-1-80%丙醇	/5CY5/rArArGrCrUrGrGrArCrUrUrCrCrCrUrArUrGrGrU
TE0512-RNA-ROX-2-80%甲醇	/5ROX/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-ROX-2-80%乙腈	/5ROX/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-ROX-2-80%乙醇	/5ROX/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-ROX-2-80%丙醇	/5ROX/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-CY5-2-80%甲醇	/5CY5/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-CY5-2-80%乙腈	/5CY5/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-CY5-2-80%乙醇	/5CY5/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU
TE0512-RNA-CY5-2-80%丙醇	/5CY5/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArU

[0060] 结论：从表4数据来看，使用80%甲醇洗脱，修饰核酸探针的回收率明显低于80%乙腈、80%乙醇和80%丙醇洗脱；同时从表5数据来看，使用上述四种溶剂洗脱，回收液中游离修饰染料的残留都比较高，超出预期标准，但是使用80%甲醇和80%乙腈洗脱，回收液中游离修饰染料的残留明显低于80%乙醇和80%丙醇洗脱，综合考虑既要尽可能提高染料修饰核酸探针的回收率，又要尽可能降低回收液中游离修饰染料的残留，因此80%乙腈溶液洗脱为本实验的最佳方案。

[0061] 实施例三 不同体积浓度乙腈水溶液洗脱的实验对于本发明来说，80%乙腈洗脱，回收液中游离修饰染料的残留仍然很高，为验证洗脱溶剂中有机溶剂的含量是否对回收溶液中游离修饰染料的残留有影响，本实施例选择五种含不同比例乙腈的水溶液，在相同的条件下进行洗脱实验。实验中仍选择修饰染料的最大吸收波长作为检测波长，对比原液与回收溶液中游离修饰染料的峰面积占比，来表征游离修饰染料的残留程度。用酶标仪测量溶液中核酸探针的吸光值再转

换成nmol值，计算核酸探针含量

[0062] 具体操作如下；

[0063] 1. 将1000nmol含有氨基结构的DNA/RNA核酸探针溶解于1000ul
pH为8.5的0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液中，充分震荡混匀；

[0064] 2. 用375ul DMF溶剂去溶解3000nmol活化酯修饰染料固体，并加入至上述缓
冲液中，充分震荡混匀；

[0065] 3. 将上述混合溶液放入摇床，震荡4-12小时；

[0066] 4. 取4nmol对应的粗品体积，在高效液相色谱上分析，计算染料最大吸收波长
下的游离染料峰面积的占比；

[0067] 5. 在C18吸附柱中加入10ml甲醇溶液，静置5min后缓慢滴下，弃废液；

[0068] 6. 在C18吸附柱中加入10ml超纯水，缓慢滴下，弃废液；

[0069] 7. 将步骤（3）所述溶液均分为5份，分别倒入5个C18吸附柱中，缓慢滴下，
弃废液；

[0070] 8. 在5个C18吸附柱的下端口分别放置10ml离心管；

[0071] 9.

在5个C18吸附柱中分别加入8ml的1%乙腈、10%乙腈、30%乙腈、50%乙腈、70%乙
腈溶液（体积比），缓慢滴下，收集回收溶液1；

[0072] 10. 更换5个C18吸附柱下端口的10ml离心管；

[0073] 11. 再在5个C18吸附柱中分别加入8ml的1%乙腈、10%乙腈、30%乙腈、50%乙腈
、70%乙腈溶液（体积比），缓慢滴下，收集回收溶液2；

[0074] 12. 更换5个C18吸附柱下端口的10ml离心管；

[0075] 13. 再在5个C18吸附柱中分别加入8ml的1%乙腈、10%乙腈、30%乙腈、50%
乙腈、70%乙腈溶液（体积比），缓慢滴下，收集回收溶液3；

[0076] 14. 对5个样品分别测量回收溶液1、回收溶液2、回收溶液3的吸光值，计算回
收溶液中修饰探针的nmol含量；

[0077] 15. 合并回收溶液1、回收溶液2、回收溶液3，取4nmol对应的合并液体体积，
在高效液相色谱上分析，计算修饰染料最大吸收波长下的游离修饰染料峰面积
的占比；

[0078] 16. 表中碱基数即指DNA/RNA中脱氧核苷酸或核苷酸的个数，核酸探针的回收率数据如表7所示，游离染料的峰面积占比数据如表8所示，各个样品核酸序列如表9所示，数据的计算公式如下：

[0079] 核酸探针回收率=回收溶液中核酸探针的含量/核酸探针的投料量

[0080] 表7

[0081]

样品编号	碱基数	修饰探针投料量/nmol	回收溶液中修饰探针的含量/nmol				总修饰探针回收率
			回收液 1	回收液 2	回收液 3	回收量合计	
TE0517-DNA-BOX-1-1%乙醇	22	196	35	15	4	54	27%
TE0517-DNA-BOX-1-10%乙醇	22	196	159	26	0	184	93%
TE0517-DNA-BOX-1-30%乙醇	22	196	173	22	1	196	99%
TE0517-DNA-BOX-1-50%乙醇	22	194	182	13	2	197	99%
TE0517-DNA-BOX-1-70%乙醇	22	196	188	9	1	198	99%
TE0517-DNA-CYS-1-1%乙醇	22	199	31	29	4	64	32%
TE0517-DNA-CYS-1-10%乙醇	22	196	152	45	0	197	99%
TE0517-DNA-CYS-1-30%乙醇	22	196	156	36	0	192	98%
TE0517-DNA-CYS-1-50%乙醇	22	199	165	29	0	194	97%
TE0517-DNA-CYS-1-70%乙醇	22	196	183	12	1	196	99%
TE0517-DNA-BOX-2-1%乙醇	55	199	51	23	11	75	38%
TE0517-DNA-BOX-2-10%乙醇	55	196	167	28	1	196	99%
TE0517-DNA-BOX-2-30%乙醇	55	199	172	26	0	198	99%
TE0517-DNA-BOX-2-50%乙醇	55	196	184	11	0	195	99%
TE0517-DNA-BOX-2-70%乙醇	55	199	188	7	1	196	99%
TE0517-DNA-CYS-2-1%乙醇	55	196	32	14	8	54	27%
TE0517-DNA-CYS-2-10%乙醇	55	199	156	40	0	196	98%
TE0517-DNA-CYS-2-30%乙醇	55	196	167	29	1	197	99%
TE0517-DNA-CYS-2-50%乙醇	55	199	179	25	1	196	99%
TE0517-DNA-CYS-2-70%乙醇	55	199	189	18	1	197	99%
TE0517-RNA-BOX-1-1%乙醇	20	196	26	16	11	53	27%
TE0517-RNA-BOX-1-10%乙醇	20	196	155	30	0	185	94%
TE0517-RNA-BOX-1-30%乙醇	20	196	183	21	0	196	99%
TE0517-RNA-BOX-1-50%乙醇	20	199	169	26	2	197	99%
TE0517-RNA-BOX-1-70%乙醇	20	196	183	14	1	198	99%
TE0517-RNA-CYS-1-1%乙醇	20	199	29	14	13	56	28%
TE0517-RNA-CYS-1-10%乙醇	20	196	161	35	0	196	99%
TE0517-RNA-CYS-1-30%乙醇	20	199	175	21	1	197	99%
TE0517-RNA-CYS-1-50%乙醇	20	196	182	15	1	198	99%
TE0517-RNA-CYS-1-70%乙醇	20	199	189	7	1	197	99%
TE0517-RNA-BOX-2-1%乙醇	52	196	41	21	10	72	36%
TE0517-RNA-BOX-2-10%乙醇	52	196	167	28	0	195	99%
TE0517-RNA-BOX-2-30%乙醇	52	199	177	19	0	196	99%
TE0517-RNA-BOX-2-50%乙醇	52	199	183	12	0	196	99%
TE0517-RNA-BOX-2-70%乙醇	52	199	185	11	2	198	99%
TE0517-RNA-CYS-2-1%乙醇	52	196	32	14	8	54	27%
TE0517-RNA-CYS-2-10%乙醇	52	199	154	39	2	195	98%
TE0517-RNA-CYS-2-30%乙醇	52	196	166	31	1	198	99%
TE0517-RNA-CYS-2-50%乙醇	52	199	171	25	1	197	99%
TE0517-RNA-CYS-2-70%乙醇	52	196	190	4	0	194	97%

[0082] 表8

[0083]

样品编号	碱基数	溶液中游离染料的峰面积占比					游离染料峰面积占比要求
		原液	回收液 1	回收液 2	回收液 3		
FE0517-DNA-R0X-1-1%乙醇	22	39.12%	0.06%	0.13%	0.19%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-1-10%乙醇	22	38.12%	0.19%	0.23%	0.32%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-1-30%乙醇	22	39.12%	7.82%	0.15%	0.02%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-1-50%乙醇	22	39.12%	11.34%	2.91%	0.95%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-1-70%乙醇	22	38.12%	18.30%	1.83%	1.39%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-1-1%乙醇	22	44.29%	0.15%	0.37%	0.23%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-1-10%乙醇	22	44.29%	0.51%	0.49%	0.60%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-1-30%乙醇	22	43.29%	8.75%	1.83%	0.89%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-1-50%乙醇	22	44.29%	14.89%	2.57%	1.17%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-1-70%乙醇	22	44.29%	22.15%	6.03%	1.39%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-2-1%乙醇	35	37.34%	0.06%	0.19%	0.12%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-2-10%乙醇	35	37.34%	0.19%	0.31%	0.31%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-2-30%乙醇	35	37.34%	7.02%	1.42%	0.19%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-2-50%乙醇	35	37.34%	10.02%	1.79%	0.86%	≤5%	
FE0517-DNA-R0X-2-70%乙醇	35	37.34%	17.58%	2.09%	1.05%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-2-1%乙醇	35	44.29%	0.15%	0.29%	0.22%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-2-10%乙醇	35	44.29%	0.44%	0.49%	0.51%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-2-30%乙醇	35	43.29%	10.49%	2.64%	0.59%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-2-50%乙醇	35	44.29%	15.47%	1.23%	0.37%	≤5%	
FE0517-DNA-CYS-2-70%乙醇	35	44.29%	21.82%	3.81%	1.25%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-1-1%乙醇	20	41.15%	0.07%	0.33%	0.27%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-1-10%乙醇	20	41.15%	0.27%	0.33%	0.32%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-1-30%乙醇	20	41.15%	8.53%	1.86%	1.13%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-1-50%乙醇	20	41.15%	9.87%	2.33%	0.52%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-1-70%乙醇	20	41.15%	14.27%	2.87%	1.19%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-1-1%乙醇	20	46.23%	0.05%	0.18%	0.23%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-1-10%乙醇	20	46.23%	0.46%	0.61%	0.54%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-1-30%乙醇	20	46.23%	7.74%	2.53%	1.07%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-1-50%乙醇	20	46.23%	11.04%	1.22%	0.69%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-1-70%乙醇	20	46.23%	16.94%	3.45%	1.69%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-2-1%乙醇	32	36.59%	0.12%	0.24%	0.09%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-2-10%乙醇	32	36.59%	0.30%	0.24%	0.16%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-2-30%乙醇	32	36.59%	8.39%	2.16%	0.90%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-2-50%乙醇	32	36.59%	11.72%	2.82%	0.59%	≤5%	
FE0517-RNA-R0X-2-70%乙醇	32	36.59%	14.04%	3.39%	0.84%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-2-1%乙醇	32	42.49%	0.07%	0.28%	0.28%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-2-10%乙醇	32	42.49%	0.46%	0.42%	0.42%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-2-30%乙醇	32	42.49%	9.17%	2.37%	0.89%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-2-50%乙醇	32	42.49%	12.32%	2.17%	1.05%	≤5%	
FE0517-RNA-CYS-2-70%乙醇	32	42.49%	17.89%	3.45%	1.47%	≤5%	

[0084] 表9

[0085]

样品编号	序列
TB0517-DNA-BOX-1-1%乙.菌	/5B0X/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-BOX-1-10%乙.菌	/5B0X/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-BOX-1-30%乙.菌	/5B0X/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-BOX-1-50%乙.菌	/5B0X/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-BOX-1-70%乙.菌	/5B0X/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0617-DNA-CYS-1-1%乙.菌	/5CYS/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-CYS-1-10%乙.菌	/5CYS/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-CYS-1-30%乙.菌	/5CYS/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-CYS-1-50%乙.菌	/5CYS/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0517-DNA-CYS-1-70%乙.菌	/5CYS/CAGTAGACTGCACATTCGTTAG
TB0617-DNA-BOX-2-1%乙.菌	/5B0X/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-BOX-2-10%乙.菌	/5B0X/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-BOX-2-30%乙.菌	/5B0X/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-BOX-2-50%乙.菌	/5B0X/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-BOX-2-70%乙.菌	/5B0X/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0617-DNA-CYS-2-1%乙.菌	/5CYS/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-CYS-2-10%乙.菌	/5CYS/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-CYS-2-30%乙.菌	/5CYS/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-CYS-2-50%乙.菌	/5CYS/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0517-DNA-CYS-2-70%乙.菌	/5CYS/AATTCFAATAGACTCACTATAGGGAATTCACAAATTCGCCAGGCTTCAGC
TB0617-DNA-BOX-1-1%乙.菌	/5B0X/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-BOX-1-10%乙.菌	/5B0X/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-BOX-1-30%乙.菌	/5B0X/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-BOX-1-50%乙.菌	/5B0X/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-BOX-1-70%乙.菌	/5B0X/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0617-DNA-CYS-1-1%乙.菌	/5CYS/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-CYS-1-10%乙.菌	/5CYS/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-CYS-1-30%乙.菌	/5CYS/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-CYS-1-50%乙.菌	/5CYS/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0517-DNA-CYS-1-70%乙.菌	/5CYS/rGArCrArGrGrArGrGrGrGrArCrArGrGrGrG
TB0617-DNA-BOX-2-1%乙.菌	/5B0X/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-BOX-2-10%乙.菌	/5B0X/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-BOX-2-30%乙.菌	/5B0X/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-BOX-2-50%乙.菌	/5B0X/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-BOX-2-70%乙.菌	/5B0X/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0617-DNA-CYS-2-1%乙.菌	/5CYS/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-CYS-2-10%乙.菌	/5CYS/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-CYS-2-30%乙.菌	/5CYS/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-CYS-2-50%乙.菌	/5CYS/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA
TB0517-DNA-CYS-2-70%乙.菌	/5CYS/rArArCrCrGrGrGrArCrCrArGrGrArGrGrArGrGrGrGrArArGrGrGrArA

[0086] 结论：从表7数据来看，使用1%乙腈溶液洗脱，总的修饰探针回收率偏低，不能达到要求。使用10%乙腈、30%乙腈、50%乙腈和70%乙腈溶液洗脱，总的探针回收率可达97%以上，但是分别从回收液1、回收液2、回收液3中修饰探针的含量来看，回收液3中修饰探针的含量极低，在总回收量中占比极少；从表8数据来看，洗脱液中乙腈的含量对游离修饰染料的残留有很大的影响，乙腈比例越高，游离修饰染料的残留越大。从回收液1的数据值来看，在30%乙腈、50%乙腈和70%乙腈溶液洗脱下，游离修饰染料的残留占比已经超出预期的不高于5%标准。综合考虑既要修饰探针的回收率高又要游离修饰染料的残留少，本实验的最佳方案为使用10%乙腈，洗脱回收两次。为进一步优化洗脱剂的浓度，再次使用5%、10%、15%、20%和25%乙腈水溶液进行了比较试验，参照上述试验过程，对上述五个浓度进行了两次洗脱实验比较，将两次洗脱回收液合并计算核酸探针的总回收率，其数据如表10所示，游离染料的峰面积占比数据如表11所示：

[0087] 表10

[0088]

样品编号	碱基数	修饰探针投料量/ nmol	回收溶液中修饰探针 的含量/nmol	修饰探针回收率
TE0517-DNA-CYS-1-0%乙醇	22	199	143	72%
TE0517-DNA-CYS-1-10%乙醇	22	199	195	98%
TE0517-DNA-CYS-1-15%乙醇	22	199	195	98%
TE0517-DNA-CYS-1-20%乙醇	22	199	196	98%
TE0517-DNA-CYS-1-25%乙醇	22	199	197	99%
TE0517-DNA-ROX-2-0%乙醇	55	199	153	77%
TE0517-DNA-ROX-2-10%乙醇	55	199	194	97%
TE0517-DNA-ROX-2-15%乙醇	55	199	195	98%
TE0517-DNA-ROX-2-20%乙醇	55	199	195	98%
TE0517-DNA-ROX-2-25%乙醇	55	199	196	98%
TE0517-RNA-ROX-1-0%乙醇	20	199	147	74%
TE0517-RNA-ROX-1-10%乙醇	20	199	193	97%
TE0517-RNA-ROX-1-15%乙醇	20	199	196	98%
TE0517-RNA-ROX-1-20%乙醇	20	199	197	99%
TE0517-RNA-ROX-1-25%乙醇	20	199	197	99%
TE0517-RNA-CYS-2-0%乙醇	52	199	140	70%
TE0517-RNA-CYS-2-10%乙醇	52	199	195	98%
TE0517-RNA-CYS-2-15%乙醇	52	199	196	98%
TE0517-RNA-CYS-2-20%乙醇	52	199	196	98%
TE0517-RNA-CYS-2-25%乙醇	52	199	197	99%

[0089] 表11

[0090]

样品编号	碱基数	溶液中游离染料的峰面积占比		
		原液	合并回收液	游离染料峰面积占比要求
TE0517-DNA-CY5-1-5%乙醇	22	44.56%	0.61%	≤5%
TE0517-DNA-CY5-1-10%乙醇	22	44.56%	1.22%	≤5%
TE0517-DNA-CY5-1-15%乙醇	22	44.56%	2.13%	≤5%
TE0517-DNA-CY5-1-20%乙醇	22	44.56%	5.82%	≤5%
TE0517-DNA-CY5-1-25%乙醇	22	44.56%	8.64%	≤5%
TE0517-DNA-ROX-2-5%乙醇	55	37.28%	0.43%	≤5%
TE0517-DNA-ROX-2-10%乙醇	55	37.28%	0.84%	≤5%
TE0517-DNA-ROX-2-15%乙醇	55	37.28%	2.56%	≤5%
TE0517-DNA-ROX-2-20%乙醇	55	37.28%	5.58%	≤5%
TE0517-DNA-ROX-2-25%乙醇	55	37.28%	7.19%	≤5%
TE0517-RNA-ROX-1-5%乙醇	20	41.21%	0.62%	≤5%
TE0517-RNA-ROX-1-10%乙醇	20	41.21%	0.85%	≤5%
TE0517-RNA-ROX-1-15%乙醇	20	41.21%	2.26%	≤5%
TE0517-RNA-ROX-1-20%乙醇	20	41.21%	5.12%	≤5%
TE0517-RNA-ROX-1-25%乙醇	20	41.21%	6.85%	≤5%
TE0517-RNA-CY5-2-5%乙醇	52	42.58%	0.63%	≤5%
TE0517-RNA-CY5-2-10%乙醇	52	42.58%	0.97%	≤5%
TE0517-RNA-CY5-2-15%乙醇	52	42.58%	3.21%	≤5%
TE0517-RNA-CY5-2-20%乙醇	52	42.58%	6.53%	≤5%
TE0517-RNA-CY5-2-25%乙醇	52	42.58%	9.34%	≤5%

[0091] 测试结果表明使用5%、10%、15%、20%和25%的乙醇溶液洗脱两次核酸探针的总回收率均能达到70%以上，但在使用20%、25%乙醇溶液洗脱时，回收液中游离修饰染料的峰面积占比已经超过5%，超出预期的标准范围，综合考虑核酸探针的回收率和游离修饰染料的残留占比，5-15%乙醇溶液为洗脱剂，可以满足本发明纯化的目的，10%乙醇溶液为洗脱剂效果最优。

[0092] 实施例四 不同类型的活化酯比较试验为拓展本发明的普遍适应性，在相同的实验条件下分别对不同染料修饰后的核酸探针进行实验，对核酸修饰探针的回收率和游离修饰染料的峰面积占比进行比较。因游离修饰染料的最大吸收波长与染料修饰核酸探针的染料最大吸收波长一致，在高效液相色谱上，选择修饰

染料的最大吸收波长作为检测波长，对比原液与回收溶液中游离修饰染料的峰面积占比，来表征游离修饰染料的去除程度。用酶标仪测量溶液中核酸探针的吸光值再转换成nmol值，计算核酸探针含量。

[0093] 具体实验方案如下：

[0094] 1. 将200nmol含有氨基结构的DNA/RNA核酸探针溶解于200u1 pH为8.5的0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液中，充分震荡混匀；

[0095] 2. 用75u1 DMF溶剂去溶解600nmol活化酯修饰染料固体，并加入至上述缓冲液中，充分震荡混匀；

[0096] 3. 将上述混合溶液放入摇床，震荡4-12小时；

[0097] 4. 取4nmol对应的粗品体积，在高效液相色谱上分析，计算染料最大吸收波长下的游离染料峰面积的占比；

[0098] 5. 在C18吸附柱中加入10ml甲醇溶液，静置5min后缓慢滴下，弃废液；

[0099] 6. 在C18吸附柱中加入10ml超纯水，缓慢滴下，弃废液；

[0100] 7. 将步骤（3）所述溶液倒入C18吸附柱中，缓慢滴下，弃废液；

[0101] 8. 在C18吸附柱的下端口放置10ml离心管；

[0102] 9. 在C18吸附柱中加入8ml的10%乙腈，缓慢滴下，收集回收溶液1

[0103] 10. 更换C18吸附柱下端口的10ml离心管

[0104] 11. 在C18吸附柱中加入8ml的10%乙腈，缓慢滴下，收集回收溶液2

[0105] 12. 合并回收溶液1、回收溶液2，测吸光值，计算回收溶液中修饰探针的nmol含量；

[0106] 13. 取4nmol对应的合并溶液体积，在高效液相色谱上分析，计算修饰染料最大吸收波长下的游离修饰染料峰面积的占比

[0107] 14. 表中碱基数即指DNA/RNA中脱氧核苷酸或核苷酸的个数，核酸探针的回收率数据如表12所示，游离染料的峰面积占比数据如表13所示，各个样品核酸序列如表14所示，数据的计算公式如下：

[0108] 核酸探针回收率=回收溶液中核酸探针的含量/核酸探针的投料量

[0109] 表12

[0110]

样品编号	碱基数	修饰探针投料量 /nmol	合并回收溶液中 修饰探针的含量 /nmol	修饰探针回收率
TEOS23-DNA-ROX-1	22	196	193	98%
TEOS23-DNA-ROX-2	66	196	189	96%
TEOS23-DNA-CY5-1	22	196	191	97%
TEOS23-DNA-CY5-2	66	196	188	96%
TEOS23-DNA-FXN	22	196	190	97%
TEOS23-DNA-FAM	22	196	189	96%
TEOS23-DNA-CY3	22	196	188	96%
TEOS23-DNA-CY5.5	22	196	193	98%
TEOS23-DNA-CY7	22	196	191	97%
TEOS23-RNA-ROX-1	21	196	189	96%
TEOS23-RNA-ROX-2	44	196	191	97%
TEOS23-RNA-CY5-1	21	196	192	98%
TEOS23-RNA-CY5-2	44	196	189	96%
TEOS23-RNA-TER	21	196	193	98%
TEOS23-RNA-FAM	21	196	190	97%
TEOS23-RNA-CY3	21	196	189	96%
TEOS23-RNA-CY5.5	21	196	188	96%
TEOS23-RNA-CY7	21	196	191	97%

[0111] 表13

[0112]

样品编号	碱基数	游离染料的峰面积占比		
		原液	回收液	游离染料峰面积占比要求
TE0523-DNA-ROX-1	22	43.27%	0.58%	≤3%
TE0523-DNA-ROX-2	56	42.23%	1.64%	≤3%
TE0523-DNA-CYS-1	22	46.55%	1.77%	≤3%
TE0523-DNA-CYS-2	56	46.27%	1.92%	≤3%
TE0523-DNA-TXN	22	46.62%	0.76%	≤3%
TE0523-DNA-TAN	22	47.58%	1.52%	≤3%
TE0523-DNA-CY3	22	46.34%	1.88%	≤3%
TE0523-DNA-CYS.5	22	45.26%	1.92%	≤3%
TE0523-DNA-CY7	22	47.22%	1.94%	≤3%
TE0523-RNA-ROX-1	21	44.13%	0.75%	≤3%
TE0523-RNA-ROX-2	44	43.67%	1.40%	≤3%
TE0523-RNA-CYS-1	21	46.32%	1.57%	≤3%
TE0523-RNA-CYS-2	44	44.22%	1.92%	≤3%
TE0523-RNA-TXN	21	46.15%	0.68%	≤3%
TE0523-RNA-TAN	21	45.25%	0.53%	≤3%
TE0523-RNA-CY3	21	45.45%	1.42%	≤3%
TE0523-RNA-CYS.5	21	46.18%	2.12%	≤3%
TE0523-RNA-CY7	21	47.16%	2.86%	≤3%

[0113] 表14

[0114]

样品编号	序列
TE0523-DNA-ROX-1	/SROX/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-ROX-2	/SROX/CAACGGAAATCCCAACATAAGCAGCTGTCTGCAACCTGAATCCCAAATAGCACCTGT
TE0523-DNA-CY3-1	/SCY3/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-CY3-2	/SCY3/CAACGGAAATCCCAACATAAGCAGCTGTCTGCAACCTGAATCCCAAATAGCACCTGT
TE0523-DNA-TXR	/STXR/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-TAM	/STAM/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-CY3	/SCY3/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-CY5.5	/SCY5.5/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-DNA-CY7	/SCY7/CACTACAGTATACATGATGTAC
TE0523-RNA-ROX-1	/SROX/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-ROX-2	/SROX/rC rArGrU rArGrU rCrU rCrU rCrArU rCrU rGrGrU rArU rCrArGrU rArGrArU rCrU rCrArU rUrU rGrU rGrU
TE0523-RNA-CY3-1	/SCY3/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-CY3-2	/SCY3/rC rArGrU rArGrU rCrU rCrU rCrArU rCrU rGrGrU rArU rCrArGrU rArGrArU rCrU rCrArU rUrU rGrU rGrU
TE0523-RNA-TXR	/STXR/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-TAM	/STAM/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-CY3	/SCY3/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-CY5.5	/SCY5.5/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU
TE0523-RNA-CY7	/SCY7/rC rCrU rUrU rGrGr rCrCrU rGrGrU rGrArGrArGrU

- [0115] 结论：从实验数据可以看出，本发明对于DNA/RNA核酸探针中不同类型游离修饰染料的残留去除都有较好的效果，特别是对于ROX、TXR、
- [0116] TAM的残留去除效果比CY3、CY5、CY5.5、CY7更好。
- [0117] 应该理解到披露的本发明不仅仅限于描述的特定的方法、方案和物质，因为这些均可变化。还应理解这里所用的术语仅仅是为了描述特定的实施
- [0118] 方式方案的目的，而不是意欲限制本发明的范围，本发明的范围仅受限于所附的权利要求。
- [0119] 本领域的技术人员还将认识到，或者能够确认使用不超过常规实验，在本文中所述的本发明的具体的实施方案的许多等价物。这些等价物也包含在所附的权利要求中。

权利要求书

- [权利要求 1] 染料修饰后的核酸探针纯化方法，其特征在于，所述方法通过吸附剂与游离修饰染料和染料修饰后的核酸探针的非极性官能团之间的作用力，将过量的游离修饰染料和所述染料修饰后的核酸探针保留在吸附剂上，然后用含有机溶剂的水溶液洗脱含吸附剂的柱子，利用所述游离修饰染料与所述染料修饰后的核酸探针之间的极性差异，将所述染料修饰后的核酸探针选择性地从吸附剂上洗脱下来，而所述游离修饰染料保留在吸附剂上，以纯化所述染料修饰后的核酸探针；所述吸附剂是 C18 吸附柱，所述含有机溶剂的水溶液中乙腈所占体积是 5- 15%。
- [权利要求 2] 根据权利要求 1 所述的核酸探针纯化方法，其特征在于，所述含有机溶剂的水溶液中乙腈所占体积是 10%。
- [权利要求 3] 根据权利要求 1 所述的核酸探针纯化方法，其特征在于，用所述含有机溶剂的水溶液洗脱二次。
- [权利要求 4] 根据权利要求 1 所述的核酸探针纯化方法，其特征在于，所述修饰染料是 ROX 、TXR 、TAM 、CY3 、CY5 、CY5.5 或 CY7。
- [权利要求 5] 根据权利要求 1 所述的核酸探针纯化方法，其特征在于，所述核酸探针是 DNA 核酸探针或 RNA 核酸探针。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/088237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
B01D 15/08(2006.01)i; B01D 15/42(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)		
B01D		
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, DWPI, EPTXT, USTXT, WOTXT, ENTXTC, CNKI, Patents: 百力格生物, 蔡晶晶, 李星豪, 苏敏, 李俊, ODS, C18, 十八烷基硅烷, 硅胶, 核酸, 核苷酸, DNA, RNA, 探针, 乙腈, 洗, 冲, 纯化, 染料, ROX, TXR, TAM, CY3, CY5, CY5.5, CY7, Texas, 琥珀酰亚胺, probe, octadecyl+, elut+, desorp+, wash+, buffer+, dilute+, acetonitrile, +nucleotide+, nucleic +, dye		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115414703 A (BIOLIGO BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 02 December 2022 (2022-12-02) claims 1-5, and description, paragraphs 7-11	1-5
X	US 2009136940 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS et al.) 28 May 2009 (2009-05-28) description, paragraphs 158-161	1-5
X	CN 113710686 A (ULTIMA GENOMICS, INC.) 26 November 2021 (2021-11-26) description, paragraphs 336-337	1-5
X	CN 112533998 A (CEPHEID) 19 March 2021 (2021-03-19) description, paragraphs 460-472	1-5
X	US 6140054 A (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 31 October 2000 (2000-10-31) page 19, left-hand column, line 45 to right-hand column, line 36	1-5
<input checked="" 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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
05 July 2023		11 August 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		
		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/088237

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013273537 A1 (UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 17 October 2013 (2013-10-17) entire document	1-5
A	CN 112969802 A (ILLUMINA, INC. et al.) 15 June 2021 (2021-06-15) entire document	1-5

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/088237

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	115414703	A	02 December 2022	CN	115414703	B	17 January 2023
US	2009136940	A1	28 May 2009	US	8084589	B2	27 December 2011
				WO	2009029868	A1	05 March 2009
CN	113710686	A	26 November 2021	AU	2020224097	A1	16 September 2021
				EP	3927720	A1	29 December 2021
				EP	3927720	A4	30 November 2022
				CA	3130693	A1	27 August 2020
				WO	2020172197	A1	27 August 2020
				JP	2022521730	A	12 April 2022
				US	2022282309	A1	08 September 2022
				KR	20210132104	A	03 November 2021
				US	2021363572	A1	25 November 2021
				US	11377680	B2	05 July 2022
CN	112533998	A	19 March 2021	KR	20210035079	A	31 March 2021
				AU	2019266218	A1	07 January 2021
				MX	2020011378	A	15 February 2021
				EP	3790931	A1	17 March 2021
				BR	112020022684	A2	17 February 2021
				WO	2019217470	A1	14 November 2019
				JP	2021523268	A	02 September 2021
				CA	3099701	A1	14 November 2019
				JP	2021523268	W	02 September 2021
US	6140054	A	31 October 2000	WO	0018965	A1	06 April 2000
				EP	1117834	A1	25 July 2001
				EP	1117834	B1	31 May 2006
				JP	2002525128	A	13 August 2002
				JP	3670967	B2	13 July 2005
				AU	6280599	A	17 April 2000
				AT	328115	T	15 June 2006
				DE	69931646	D1	06 July 2006
				DE	69931646	T2	16 May 2007
US	2013273537	A1	17 October 2013	US	9540680	B2	10 January 2017
CN	112969802	A	15 June 2021	JP	2022522076	A	14 April 2022
				IL	281861	A	31 May 2021
				CA	3114733	A1	10 September 2020
				KR	20210134599	A	10 November 2021
				AU	2020231007	A1	29 April 2021
				MX	2021003777	A	21 July 2021
				TW	202100751	A	01 January 2021
				NL	2023327	B1	17 September 2020
				EP	3837384	A1	23 June 2021
				SG	11202103214	TA	29 September 2021
				US	2022049292	A1	17 February 2022
				WO	2020178231	A1	10 September 2020

<p>A. 主题的分类</p> <p>B01D 15/08 (2006.01) i; B01D 15/42 (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>B01D</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, CNTXT, DWPI, EPTXT, USTXT, WOTXT, ENTXTC, CNKI, Patentics; 百力格生物, 蔡晶晶, 李星豪, 苏敏, 李俊, ODS, C18, 十八烷基硅烷, 硅胶, 核酸, 核苷酸, DNA, RNA, 探针, 乙腈, 洗, 冲, 纯化, 染料, ROX, TXR, TAM, CY3, CY5, CY5.5, CY7, Texas, 琥珀酰亚胺, probe, octadecyl+, elut+, desorp+, wash+, buffer+, dilute+, acetonitrile, +nucleotide+, nucleic+, dye</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>PX</td> <td>CN 115414703 A (百力格生物科技(上海)股份有限公司) 2022年12月2日 (2022 - 12 - 02) 权利要求1-5, 说明书第7-11段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2009136940 A1 (UNIV. MASSACHUSETTS 等) 2009年5月28日 (2009 - 05 - 28) 说明书第158-161段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 113710686 A (阿尔缇玛基因组学公司) 2021年11月26日 (2021 - 11 - 26) 说明书第336-337段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 112533998 A (塞弗德公司) 2021年3月19日 (2021 - 03 - 19) 说明书第460-472段</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 6140054 A (UNIV. UTAH RES. FOUND.) 2000年10月31日 (2000 - 10 - 31) 第19页左栏第45行-右栏第36行</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013273537 A1 (UNIV. PENNSYLVANIA) 2013年10月17日 (2013 - 10 - 17) 全文</td> <td>1-5</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	PX	CN 115414703 A (百力格生物科技(上海)股份有限公司) 2022年12月2日 (2022 - 12 - 02) 权利要求1-5, 说明书第7-11段	1-5	X	US 2009136940 A1 (UNIV. MASSACHUSETTS 等) 2009年5月28日 (2009 - 05 - 28) 说明书第158-161段	1-5	X	CN 113710686 A (阿尔缇玛基因组学公司) 2021年11月26日 (2021 - 11 - 26) 说明书第336-337段	1-5	X	CN 112533998 A (塞弗德公司) 2021年3月19日 (2021 - 03 - 19) 说明书第460-472段	1-5	X	US 6140054 A (UNIV. UTAH RES. FOUND.) 2000年10月31日 (2000 - 10 - 31) 第19页左栏第45行-右栏第36行	1-5	A	US 2013273537 A1 (UNIV. PENNSYLVANIA) 2013年10月17日 (2013 - 10 - 17) 全文	1-5
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 115414703 A (百力格生物科技(上海)股份有限公司) 2022年12月2日 (2022 - 12 - 02) 权利要求1-5, 说明书第7-11段	1-5																					
X	US 2009136940 A1 (UNIV. MASSACHUSETTS 等) 2009年5月28日 (2009 - 05 - 28) 说明书第158-161段	1-5																					
X	CN 113710686 A (阿尔缇玛基因组学公司) 2021年11月26日 (2021 - 11 - 26) 说明书第336-337段	1-5																					
X	CN 112533998 A (塞弗德公司) 2021年3月19日 (2021 - 03 - 19) 说明书第460-472段	1-5																					
X	US 6140054 A (UNIV. UTAH RES. FOUND.) 2000年10月31日 (2000 - 10 - 31) 第19页左栏第45行-右栏第36行	1-5																					
A	US 2013273537 A1 (UNIV. PENNSYLVANIA) 2013年10月17日 (2013 - 10 - 17) 全文	1-5																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <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>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</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>2023年7月5日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年8月11日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>黄鑫</p> <p>电话号码 (+86) 010-53962758</p>																					

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
A	CN 112969802 A (伊鲁米那股份有限公司 等) 2021年6月15日 (2021 - 06 - 15) 全文	1-5

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/088237

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	115414703	A	2022年12月2日	CN	115414703	B	2023年1月17日
US	2009136940	A1	2009年5月28日	US	8084589	B2	2011年12月27日
				WO	2009029868	A1	2009年3月5日
CN	113710686	A	2021年11月26日	AU	2020224097	A1	2021年9月16日
				EP	3927720	A1	2021年12月29日
				EP	3927720	A4	2022年11月30日
				CA	3130693	A1	2020年8月27日
				WO	2020172197	A1	2020年8月27日
				JP	2022521730	A	2022年4月12日
				US	2022282309	A1	2022年9月8日
				KR	20210132104	A	2021年11月3日
				US	2021363572	A1	2021年11月25日
				US	11377680	B2	2022年7月5日
CN	112533998	A	2021年3月19日	KR	20210035079	A	2021年3月31日
				AU	2019266218	A1	2021年1月7日
				MX	2020011378	A	2021年2月15日
				EP	3790931	A1	2021年3月17日
				BR	112020022684	A2	2021年2月17日
				WO	2019217470	A1	2019年11月14日
				JP	2021523268	A	2021年9月2日
				CA	3099701	A1	2019年11月14日
				JP	2021523268	W	2021年9月2日
US	6140054	A	2000年10月31日	WO	0018965	A1	2000年4月6日
				EP	1117834	A1	2001年7月25日
				EP	1117834	B1	2006年5月31日
				JP	2002525128	A	2002年8月13日
				JP	3670967	B2	2005年7月13日
				AU	6280599	A	2000年4月17日
				AT	328115	T	2006年6月15日
				DE	69931646	D1	2006年7月6日
				DE	69931646	T2	2007年5月16日
US	2013273537	A1	2013年10月17日	US	9540680	B2	2017年1月10日
CN	112969802	A	2021年6月15日	JP	2022522076	A	2022年4月14日
				IL	281861	A	2021年5月31日
				CA	3114733	A1	2020年9月10日
				KR	20210134599	A	2021年11月10日
				AU	2020231007	A1	2021年4月29日
				MX	2021003777	A	2021年7月21日
				TW	202100751	A	2021年1月1日
				NL	2023327	B1	2020年9月17日
				EP	3837384	A1	2021年6月23日
				SG	11202103214	TA	2021年9月29日
				US	2022049292	A1	2022年2月17日
				WO	2020178231	A1	2020年9月10日