

(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
2022年2月24日 (24.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/036862 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 21/04 (2006.01) *C07H 21/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/125164

(22) 国际申请日: 2020年10月30日 (30.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010828506.7 2020年8月18日 (18.08.2020) CN

(71) 申请人: 苏州金唯智生物科技有限公司
(GENEWIZ INC., SZ) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 曹春艳 (CAO, Chunyan); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。赵双 (ZHAO, Shuang); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。靳开宝 (JIN, Kaibao); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。纪磊 (JI, Lei); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。韩承昊 (HAN, Chenghao); 中国江苏省苏

州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。朱知浩 (ZHU, Zhihao); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米科技园, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: AMMONOLYSIS SOLUTION AND AMMONOLYSIS METHOD

(54) 发明名称: 一种氨解液及氨解方法

(57) Abstract: An ammonolysis solution and an ammonolysis method. The ammonolysis solution comprises amine, butanol, amino alcohol, and an alkaline aqueous solution. The ammonolysis method comprises: (1) adding an ammonolysis solution to a solid-phase synthesis column where a solid phase carrier is contained; (2) placing the solid-phase synthesis column into a sealed container where an ammonolysis buffer solution is contained, and keeping the solid-phase synthesis column from contacting with the ammonolysis buffer solution; (3) heating the sealed container, so that the solid phase carrier is under a steam atmosphere of the ammonolysis buffer solution, and then cooling; and (4) taking the solid-phase synthesis column out of the sealed container, treating the solid phase carrier in the solid-phase synthesis column using an eluent, and collecting an effluent liquid. The ammonolysis solution is mild in formula. The ammonolysis buffer solution not only provides an ammonolysis atmosphere, but also assists in an ammonolysis reaction. The ammonolysis process does not use toxic gases, is safe and environmentally friendly, and does not damage the primer structure; meanwhile, the post-treatment steps are simple, cross contamination is avoided, and the large-scale industrial application can be achieved.

(57) 摘要: 一种氨解液及氨解方法, 所述氨解液包括胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液, 所述氨解方法包括: (1) 向装有固相载体的固相合成柱中加入氨解液; (2) 将所述固相合成柱置于装有氨解缓冲液的密封容器内, 并保持所述固相合成柱不接触氨解缓冲液; (3) 加热所述密封容器, 使固相载体处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中, 随后冷却; (4) 从所述密封容器中取出固相合成柱, 用洗脱液处理固相合成柱中的固相载体, 并收集流出液。所述氨解液配方温和, 氨解缓冲液不仅提供氨解氛围, 而且辅助氨解反应, 氨解工艺不使用有毒气体、安全性高、环境友好、不破坏引物结构, 同时后处理步骤简单, 避免交叉污染, 可以实现大规模工业化应用。

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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种氨解液及氨解方法

技术领域

本申请属于核酸的合成技术领域，涉及一种氨解液及氨解方法。

背景技术

短链 DNA 又称为寡核苷酸 (Oligo)，通常采用固相合成技术进行人工合成。固相合成以控制孔径玻璃球 (CPG) 为固相载体，以亚磷酰胺为单体，按照 3'-5' 方向，经过脱保护、缩合、氧化和盖帽四个反应的循环，将目标序列逐渐连接在固相载体上。固相合成方法的优势在于：每一步反应都在固相载体上进行，反应结束后可以将未反应的原料通过抽滤的方式除去，后处理步骤简单。因此，固相合成被广泛应用于 Oligo 和多肽合成。在现在大部分的 Oligo 合成工艺中，亚磷酰胺单体的 5'-OH 被二甲氧基三苯基 (DMT) 基团保护，可以在 2~3% $\text{CCl}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 溶液中被切除，称为脱保护反应；脱保护后裸露出的自由羟基与亚磷酰胺发生亲核取代反应，即缩合反应；缩合反应结束后，为避免未反应的羟基进入下一轮缩合，需要将未反应的自由羟基乙酰化，俗称“盖帽”；最后，由于亚磷酰胺非常不稳定，需要用氧化剂如碘液将亚磷酰胺氧化为 +5 价磷。每连接一个碱基都需要经历四个反应，将目标碱基全部合成后，将 Oligo 从 CPG 上剪切下来。同时，由于 A、C、G 碱基含有活性氨基，会干扰缩合反应，所以一般预先采用乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz) 和二氮甲基甲脒基 (dmf) 将氨基保护，当反应结束后，再将 Ac、Bz 和 dmf 基团切除。在这里，将 Oligo 从 CPG 上剪切下来和脱除保护基的反应称为氨解反应。氨解反应的主要包括：(1) 将 Oligo 从固相载体上切割下来；(2) 将 Oligo 的 3'-OH 暴露；(3) 将 A、C、G 碱基上的保护基 Ac、Bz、dmf 切除；(4) 将磷酸上的氰乙基切除。

氨解反应最初采用氨水进行，其问题主要包括反应时间长，55℃ 反应需要 16 小时，65℃ 反应需要 8 小时；在反应过程中需要将合成柱浸泡在氨水中，容易造成交叉污染；由于氨水可以溶解 Oligo，后处理步骤繁琐；氨水中的杂质会积累，造成 Oligo 污染。后来研发的甲胺:氨水=1:1 (AMA) 的氨解反应体系大大降低了反应时间 (M.P. Reddy, N.B. Hanna, and F. Farooqui, *Nucleos. Nucleot.*, 1997, 16, 1589-1598.)，但是仍然存在交叉污染和后处理步骤繁琐等问题。气相氨解采用氨气为活性介质，以耐高压的氨解锅为反应容器，在高温高压的反应条件下进行氨解反应。气相氨解的优势在于反应快速高效、操作简单，但是存在对设备要求高、需要使用有毒气体、存在安全隐患、污染环境、对引物的结构破坏性较大的缺点。微波氨解是近年来广泛应用的工艺，主要以微波作为加热手段，但是在实际操作过程中，微波加热很容易造成受热不均匀，持续加热会引起液体爆沸，造成损失和引起交叉污染。

CN109956987A 公开了一种用于在 DNA 固相合成后进行氨解的方法，包括以下步骤：1) 向包括用于合成 DNA 片段的固相载体的合成柱内加入氨解组合物；2) 将所述合成柱置于装有氨解缓冲液的可密封容器内，并保持所述合成柱位于所述氨解缓冲液的液面上方；以及 3)

以微波处理所述可密封容器，使得所述固相载体处于所述氨解缓冲液的蒸汽气氛中；4)取出所述合成柱，以洗脱液处理所述固相载体并收集流出液。但是该方法仍然存在微波加热受热不均匀、容易造成损伤或引起交叉污染的问题。

因此，需要研发一种新的氨解方法，反应条件温和，不会破坏引物结构，解决现有技术存在的问题。

发明内容

本申请提供了一种氨解液及氨解方法，所述氨解液配方温和，氨解缓冲液不仅提供氨解氛围，而且辅助氨解反应，氨解工艺不使用有毒气体、安全性高、环境友好、不破坏引物结构，同时后处理步骤简单，避免交叉污染。

第一申请，本申请提供了一种氨解液，所述氨解液包括胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液。

本申请中，胺与两种醇相互配合，将合成的寡核苷酸从固相载体上切割下来，并去除 A、C、G 碱基上的保护基 Ac、Bz、dmf，其中，胺的作用为氨解液的活性成分，丁醇的作用为反应溶剂，氨基醇兼具有两种作用。

本申请同时在氨解液中加入微量碱性水溶液，发挥催化剂的作用，与胺、丁醇和氨基醇相互配合，有助于加快氨解反应速率，既起到氨解催化作用，又不影响寡核苷酸的产率和品质。

优选地，所述胺包括丙胺和/或丁胺。

优选地，所述丙胺包括正丙胺和/或异丙胺。

优选地，所述丁胺包括正丁胺、异丁胺、仲丁胺或叔丁胺中的任意一种或至少两种的组合，优选为正丁胺。

本申请中，采用的丙胺和/或丁胺作为氨解液的活性成分，与丁醇、氨基醇和碱性水溶液相互配合，发挥高效的氨解活性，在特定配比下实现高效的氨解反应。

优选地，所述丁醇包括正丁醇、异丁醇、仲丁醇或叔丁醇中的任意一种或至少两种的组合，优选为正丁醇。

优选地，所述氨基醇包括氨基丁醇和/或氨基戊醇。

优选地，所述氨基戊醇包括 5-氨基-1-戊醇和/或 4-氨基-1-戊醇，优选为 5-氨基-1-戊醇。

优选地，所述碱性水溶液包括 LiOH 水溶液、NaOH 水溶液、KOH 水溶液、Be(OH)₂ 水溶液、Mg(OH)₂ 水溶液或 Ca(OH)₂ 水溶液中的任意一种或至少两种的组合。

优选地，所述碱性水溶液的浓度为 1~10 M，例如可以是 1 M、2 M、3 M、4 M、5 M、6 M、7 M、8 M、9 M 或 10 M，优选为 5 M。

本申请中，将碱性水溶液的浓度限定在 1~10 M 的范围内，有助于高效进行氨解反应，碱性水溶液的浓度不能过低或过高，浓度过低不能发挥促进氨解反应的作用，浓度过高会影响寡核苷酸的产率和纯度，洗脱得到的寡核苷酸在质谱检测时容易产生盐峰，干燥后寡核苷酸可能外观发白。

优选地，所述胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液的体积比为(5~10):(1~5):1:(0.01~0.1)，例如可以是 5:1:1:0.01、5:2:1:0.05、5:5:1:0.1、6:1:1:0.01、6:2:1:0.05、6:5:1:0.1、7:1:1:0.01、7:2:1:0.05、7:5:1:0.1、8:1:1:0.01、8:2:1:0.05、8:5:1:0.1、9:1:1:0.01、9:2:1:0.05、9:5:1:0.1、10:1:1:0.01、10:2:1:0.05 或 10:5:1:0.1，优选为(6~8):(2~3):1:(0.04~0.06)。

本申请中，胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液在特定配比下相互配合，胺、丁醇和氨基醇作为氨解液的主要功效成分，将合成的寡核苷酸从固相载体上切割下来，并去除 A、C、G 碱基上的保护基 Ac、Bz、dmf，微量的碱性水溶液发挥氨解催化作用，不仅提高了寡核苷酸产率，而且避免了寡核苷酸外观发白现象，获得的寡核苷酸纯度高。

优选地，所述正丁胺、正丁醇、5-氨基-1-戊醇和 NaOH/KOH 水溶液的体积比为(5~10):(1~5):1:(0.01~0.1)，优选为(6~8):(2~3):1:(0.04~0.06)。

本申请中，碱性水溶液在氨解液中的比例同样不能过低或过高，比例过低不能发挥促进氨解反应的作用，比例过高会影响寡核苷酸的产率和纯度。

第二方面，本申请提供了一种氨解缓冲液，所述氨解缓冲液包括氨水和/或有机胺。

本申请中，氨解缓冲液在加热条件下气化为蒸汽，提供适宜的氨解环境，有助于提高氨解效率；当采用氨水作为氨解缓冲液时，气化后的氨气既可以提供适宜的氨解环境，又可以辅助液相氨解进行气相氨解反应，显著提高了氨解效率和寡核苷酸产率，缩短了反应时间。

优选地，所述有机胺包括二乙胺、乙二胺或吡啶中的任意一种或至少两种的组合。

本申请中，当采用有机胺作为氨解缓冲液时，气化后的有机胺既可以提供适宜的氨解环境，又可以辅助液相氨解进行气相氨解反应，显著提高了氨解效率和寡核苷酸产率，缩短了反应时间。

第三方面，本申请提供了一种氨解方法，所述方法包括以下步骤：

- (1) 向装有固相载体的固相合成柱中加入第一方面所述的氨解液；
- (2) 将所述固相合成柱置于装有第二方面所述的氨解缓冲液的密封容器内，并保持所述固相合成柱不接触氨解缓冲液；
- (3) 加热所述密封容器，使固相载体处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中，随后冷却；
- (4) 从所述密封容器中取出固相合成柱，用洗脱液处理固相合成柱中的固相载体，并收集流出液。

本申请中，采用第一方面所述的氨解液浸没固相载体，在温和的加热条件下即可发生氨解反应，密封容器中的氨解缓冲液发生气化，促进氨解反应发生和持续进行，将合成的寡核苷酸从固相载体上切割下来，将碱基上的氨基保护基团去除，有利于获得纯度高、产率高的寡核苷酸产品。

优选地，步骤(1)所述固相载体包括控制孔径玻璃球。

根据本申请，控制孔径玻璃球(Controlled Pore Glass, CPG)的球体之间存在空隙，氨解液流动于其中进行氨解反应，将寡核苷酸从 CPG 上切割下来。

优选地，步骤(1)所述固相载体上连接有合成的寡核苷酸，所述寡核苷酸是人工合成的

DNA 短链，通常由 20~60 个碱基组成，可以作为引物、测序接头、探针等，本申请的氨解液可以将人工合成的 DNA 短链从固相载体上切割下来，将 A、C、G 碱基上的氨基保护基团 Ac、Bz、dmf 切除。

优选地，步骤（1）所述氨解液浸没固相载体。

优选地，步骤（2）所述密封容器包括金属密封盒。

本申请中，采用金属密封盒作为氨解盒，提供一个稍高于大气压的氛围，金属是热的良导体，有利于将加热装置提供的加热温度快速传递到氨解盒内部，高效引发氨解缓冲液气化和氨解反应的发生；同时，密封的氨解盒有效避免了氨解液和氨解缓冲液的挥发损失，有助于高效完成氨解反应。

优选地，步骤（3）所述加热的温度一方面使氨解缓冲液达到气化的温度，在密封容器中形成氨解缓冲液的蒸汽气氛，从而使固相合成柱处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中，促进氨解液发挥氨解作用，将合成的寡核苷酸从固相载体上剪切下来，所述加热的温度优选为 45~100℃，例如可以是 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃或 100℃，进一步优选为 90~95℃。

优选地，步骤（3）所述加热的时间与合成规格、氨解液配方、加热温度、密封容器体积和期望氨解反应的完成程度有关，根据具体实施情况调整，所述加热的时间优选为 30~60 min，例如可以是 30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、55 min 或 60 min。

优选地，步骤（3）所述冷却为冰浴 5~15 min，优选为冰浴冷却 10 min。

优选地，步骤（4）所述洗脱液包括水和/或 Tris-HCl。

优选地，所述 Tris-HCl 的浓度为 10~30 mM，例如可以是 10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、26 mM、27 mM、28 mM、29 mM 或 30 mM，优选为 25 mM。

优选地，所述 Tris-HCl 的 pH 为 7~8，例如可以是 7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8，优选为 7.2。

优选地，在步骤（4）所述用洗脱液处理固相合成柱中的固相载体之前，还包括干燥和洗涤所述固相合成柱的步骤。

优选地，所述干燥为在 50~60℃下处理 1~5 min，去除固相合成柱表面凝结的氨解缓冲液滴，所述干燥的温度例如可以是 50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃或 60℃，优选为 55℃，所述干燥的时间例如可以是 1 min、2 min、3 min、4 min 或 5 min，优选为 3 min。

优选地，所述洗涤采用的洗涤液包括 100%乙腈和/或 80~95%乙腈，用于去除未反应的试剂和反应副产物。

优选地，所述洗涤包括：将干燥后的固相合成柱依次采用 100%乙腈和 80~95%乙腈洗涤。

优选地，在洗涤所述固相合成柱之后还包括离心的步骤。

作为优选技术方案，本申请提供了一种氨解方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 向装有连接了合成的寡核苷酸的控制孔径玻璃球的固相合成柱中加入第一方面所述的氨解液，浸没控制孔径玻璃球；

(2) 将所述固相合成柱置于装有氨解缓冲液的金属密封容器内，并保持所述固相合成柱不接触氨解缓冲液，所述氨解缓冲液包括氨水和/或有机胺；

(3) 将所述金属密封容器在 45~100℃ 下加热 30~60 min，使连接了合成的寡核苷酸的控制孔径玻璃球处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中，随后冰浴冷却 5~15 min；

(4) 从所述密封容器中取出固相合成柱，50~60℃ 下干燥 1~5 min，并依次用 100% 乙腈和 80~95% 乙腈洗涤，离心后用水和/或 10~25 mM pH 7~8 的 Tris-HCl 处理固相合成柱中的固相载体，并收集流出液。

与现有技术相比，本申请具有如下有益效果：

(1) 本申请的氨解液配方简洁，丁胺、丁醇和氨基戊醇相互配合，将合成的寡核苷酸从固相载体上切割下来，并去除 A、C、G 碱基上的保护基 Ac、Bz、dmf，氨解液进一步添加有碱性水溶液，加快了氨解反应速率；

(2) 本申请的氨解反应在密封的金属氨解盒中进行，内部的氨解缓冲液在加热的条件下气化，为氨解反应提供适宜的氨解环境，氨水作为氨解缓冲液不仅提供了适宜的氨解环境，而且具有气相氨解的效果，可以辅助液相氨解反应；

(3) 本申请的氨解工艺条件温和、成本低廉、环境友好、安全性高，具有重要的应用价值。

附图说明

图 1 为 23 个碱基长度的寡核苷酸的 HPLC 谱图；

图 2 为 23 个碱基长度的寡核苷酸的 ESI 质谱图；

图 3 为 60 个碱基长度的寡核苷酸的 HPLC 谱图；

图 4 为 60 个碱基长度的寡核苷酸的 ESI 质谱图；

图 5 为 86 个碱基长度的寡核苷酸的 HPLC 谱图；

图 6 为 86 个碱基长度的寡核苷酸的 ESI 质谱图。

具体实施方式

为进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果，以下结合实施例和附图对本申请作进一步地说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本申请，而非对本申请的限定。

实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

实施例 1

本实施例对长度分别为 23 个碱基、60 个碱基和 86 个碱基的引物进行氨解反应，序列分别为：

SEQ ID NO: 1 (23 nt)，目标分子量为 7030.6：

5'-CATTCTAGCTCGGATCGTGTAC-3'；

SEQ ID NO: 2 (60 nt)，目标分子量为 18270.8：

5'-GCATGGCGACCTTATCAGTCTACGTCCTTTGTCTTCCTAAGACCGCTTGGCCTCC
GACTT-3'；

SEQ ID NO: 3 (86 nt)，目标分子量为 26543.2：

5'-GCCTGCTTGAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCACGCGTTTAATTAACCATATCATCTA
GTGTTGCATATGAGACAAGGACTTTTCCCAT-3'。

步骤如下：

引物合成

使用 50 nmol 合成柱，活化剂为含有 0.25 M 5-乙硫基四氮唑 (ETT) 的乙腈溶液，脱保护试剂为含有 3%三氯乙酸的二氯甲烷溶液，盖帽试剂为 10%乙酸酐/乙腈和 N-甲基咪唑/吡啶/乙腈 (比例为 14:10:76)，氧化剂为含有 0.05 M 碘的四氢呋喃/吡啶/水 (比例为 70:20:10)，合成反应在 Dr. Oligo 192 合成仪上进行。

液相氨解

(1) 向固相合成柱中加入 20 μ L 氨解液，浸没连接有合成的引物的 CPG，氨解液的配方为正丁胺:正丁醇:5-氨基-1-戊醇:NaOH 水溶液 (5 M) 的体积比为 6:3:1:0.05；

(2) 将 20 mL 氨水倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中；

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中，静置 1 min，将金属盒盖紧，用螺丝固定密封，保证固相合成柱不接触氨解缓冲液；

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱，90 $^{\circ}$ C 加热 60 min，反应结束后，将金属氨解盒取出，放入冰水浴中冷却 10 min；

(5) 取出金属氨解盒，松开螺丝，取出合成板，放入烘箱中 55 $^{\circ}$ C 干燥 3 min，取出放凉至室温；

(6) 用 100%乙腈洗涤两次，每次加入 100 μ L，随后用 100 μ L 90%乙腈/水洗涤一次；

(7) 取出合成板，3000 rpm 下离心 1 min；

(8) 加入 100 μ L 25 mM、pH7.2 的 Tris-HCl 洗脱液洗脱，收集流出液进行质谱分析。

长度分别为 23 个碱基、60 个碱基和 86 个碱基的引物的 HPLC 谱图和 ESI 质谱图分别如图 1、图 2、图 3、图 4、图 5 和图 6 所示，可以看出，液相氨解处理的不同长度的引物的 HPLC 纯度、质谱均能够达到行业标准，证明本申请的氨解方法对不同长度的寡核苷酸均具有较好的氨解效果。

实施例 2

本实施例采用实施例 1 的氨解方法，对 96 条长度为 40~60 碱基的引物进行氨解，分析

质谱合格率和产量。

步骤如下：

引物合成

使用 5 nmol 合成柱，活化剂为含有 0.25 M 5-乙硫基四氮唑（ETT）的乙腈溶液，脱保护试剂为含有 3%三氯乙酸的二氯甲烷溶液，盖帽试剂为 10%乙酸酐/乙腈和 N-甲基咪唑/吡啶/乙腈（比例为 14:10:76），氧化剂为含有 0.05 M 碘的四氢呋喃/吡啶/水（比例为 70:20:10），合成反应在 Dr. Oligo 768 合成仪上进行。

液相氨解

（1）向固相合成柱中加入 20 μ L 氨解液，浸没连接有合成的引物的 CPG，氨解液的配方为正丁胺:正丁醇:5-氨基-1-戊醇:NaOH 水溶液（5 M）的体积比为 7:2:1:0.05；

（2）将 20 mL 氨水倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中；

（3）小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中，静置 1 min，将金属盒盖紧，用螺丝固定密封，保证固相合成柱不接触氨解缓冲液；

（4）小心将金属氨解盒放入烘箱，90 $^{\circ}$ C 加热 60 min，反应结束后，将金属氨解盒取出，放入冰水浴中冷却 10 min；

（5）取出金属氨解盒，松开螺丝，取出合成板，放入烘箱中 55 $^{\circ}$ C 干燥 3 min，取出放凉至室温；

（6）用 100%乙腈洗涤两次，每次加入 200 μ L，随后用 200 μ L 90%乙腈/水洗涤一次；

（7）取出合成板，3000 rpm 离心 1 min；

（8）加入 200 μ L 25 mM、pH7.2 的 Tris-HCl 洗脱液洗脱，收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

气相氨解

（1）将下机后的合成板直接放入气相氨解锅中，90 $^{\circ}$ C、80~100 MPsi 条件下反应 40 min；

（2）小心将合成板从氨解锅中取出，放入烘箱中 55 $^{\circ}$ C 干燥 3 min，取出放凉至室温；

（3）用 100%乙腈洗涤两次，每次加入 200 μ L，随后用 200 μ L 90%乙腈/水洗涤一次；

（4）取出合成板，3000 rpm 离心 1 min；

（5）加入 200 μ L 25 mM、pH7.2 的 Tris-HCl 洗脱液洗脱，收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

液相氨解和气相氨解的引物产量和纯度如表 1 所示，可以看出，与气相氨解相比，采用本申请的液相氨解方法获得的 96 条引物的平均产量更高；以 75%的质谱纯度为合格标准，液相氨解的质谱合格率也比气相氨解的合格率稍高。说明本申请的液相氨解方法与常规的气相氨解相比，寡核苷酸的引物和纯度均得到提升。

表 1 96 条引物的平均产量和纯度

氨解方法	产量 (nmol)	纯度 (%)
气相氨解	3.26	96.9
液相氨解	3.59	98.9

表 2 为液相氨解和气相氨解的 NGS 纯度与交叉污染对比, 可以看出, 液相氨解制备的寡核苷酸纯度高、板内和板间交叉污染率低。

表 2

液相氨解				气相氨解			
样品编号	纯度	板内污染	板间污染	样品编号	纯度	板内污染	板间污染
液相-E1	99.98%	0.02%	0.00%	气相-B1	99.97%	0.02%	0.01%
液相-H1	99.99%	0.01%	0.00%	气相-E1	99.98%	0.02%	0.00%
液相-A2	100.00%	0.00%	0.00%	气相-H1	99.95%	0.03%	0.00%
液相-B2	100.00%	0.00%	0.00%	气相-A2	99.84%	0.16%	0.00%
液相-F2	99.99%	0.01%	0.00%	气相-B2	99.99%	0.01%	0.00%
平均值	99.99%	0.04%	0.00%	平均值	99.95%	0.05%	0.00%

实施例 3

本实施例采用 50 nmol 合成柱合成 96 条长度为 40~60 碱基的引物, 合成步骤参见实施例 2, 进行氨解后分析质谱合格率和产量, 步骤如下:

(1) 向固相合成柱中加入 20 μ L 氨解液, 浸没连接有合成的引物的 CPG, 氨解液的配方为异丁胺:正丁醇:5-氨基-1-戊醇:KOH 水溶液 (6 M) 的体积比为 6:2:1:0.04;

(2) 将 20 mL 氨水倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中;

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中, 静置 1 min, 将金属盒盖紧, 用螺丝固定密封, 保证固相合成柱不接触氨解缓冲液;

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱, 95 $^{\circ}$ C 加热 40 min, 反应结束后, 将金属氨解盒取出, 放入冰水浴中冷却 10 min;

(5) 取出金属氨解盒, 松开螺丝, 取出合成板, 放入烘箱中 55 $^{\circ}$ C 干燥 3 min, 取出放凉至室温;

(6) 用 100%乙腈洗涤两次, 每次加入 200 μ L, 随后用 200 μ L 90%乙腈/水洗涤一次;

(7) 取出合成板, 3000 rpm 离心 1 min;

(8) 加入 200 μ L 25 mM、pH7.2 的 Tris-HCl 洗脱液洗脱, 收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

实施例 4

本实施例采用 50 nmol 合成柱合成的 96 条长度为 40~60 碱基的引物, 合成步骤参见实施例 2, 进行氨解后分析质谱合格率和产量, 步骤如下:

(1) 向固相合成柱中加入 20 μL 氨解液, 浸没连接有合成的引物的 CPG, 氨解液的配方为正丙胺:异丁醇:4-氨基-1-戊醇:LiOH (4 M) 的体积比为 6:2:1:0.06;

(2) 将 20 mL 二乙胺倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中;

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中, 静置 1 min, 将金属盒盖紧, 用螺丝固定密封, 保证固相合成柱不接触氨解缓冲液;

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 50 min, 反应结束后, 将金属氨解盒取出, 放入冰水浴中冷却 10 min;

(5) 取出金属氨解盒, 松开螺丝, 取出合成板, 放入烘箱中 55 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 min, 取出放凉至室温;

(6) 用 100%乙腈洗涤两次, 每次加入 200 μL , 随后用 200 μL 90%乙腈/水洗涤一次;

(7) 取出合成板, 3000 rpm 离心 1 min;

(8) 加入 200 μL 20 mM、pH7.2 的 Tris-HCl 洗脱液洗脱, 收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

实施例 5

本实施例采用 50 nmol 合成柱合成的 96 条长度为 40~60 碱基的引物, 合成步骤参见实施例 2, 进行氨解后分析质谱合格率和产量, 步骤如下:

(1) 向固相合成柱中加入 20 μL 氨解液, 浸没连接有合成的引物的 CPG, 氨解液的配方为仲丁胺:异丁醇:4-氨基-1-戊醇:Be(OH)₂ 水溶液 (2 M) 的体积比为 8:3:1:0.05;

(2) 将 20 mL 二乙胺倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中;

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中, 静置 1 min, 将金属盒盖紧, 用螺丝固定密封, 保证固相合成柱不接触氨解缓冲液;

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min, 反应结束后, 将金属氨解盒取出, 放入冰水浴中冷却 10 min;

(5) 取出金属氨解盒, 松开螺丝, 取出合成板, 放入烘箱中 55 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 min, 取出放凉至室温;

(6) 用 100%乙腈洗涤两次, 每次加入 200 μL , 随后用 200 μL 80%乙腈/水洗涤一次;

(7) 取出合成板, 3000 rpm 离心 1 min;

(8) 加入 200 μL 纯水洗脱液洗脱, 收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

实施例 6

本实施例采用 50 nmol 合成柱合成的 96 条长度为 40~60 碱基的引物, 合成步骤参见实施例 2, 进行氨解后分析质谱合格率和产量, 步骤如下:

(1) 向固相合成柱中加入 20 μL 氨解液, 浸没连接有合成的引物的 CPG, 氨解液的配方为叔丁胺:仲丁醇:氨基丁醇:Mg(OH)₂ 水溶液 (1 M) 的体积比为 5:1:1:0.1;

(2) 将 20 mL 乙二胺倒入规格为 170 mm \times 130 mm \times 95 mm 的金属氨解盒中;

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中, 静置 1 min, 将金属盒盖紧,

用螺丝固定密封，保证固相合成柱不接触氨解缓冲液；

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱，60℃加热 35 min，反应结束后，将金属氨解盒取出，放入冰水浴中冷却 10 min；

(5) 取出金属氨解盒，松开螺丝，取出合成板，放入烘箱中 55℃干燥 3 min，取出放凉至室温；

(6) 用 100%乙腈洗涤两次，每次加入 200 μ L，随后用 200 μ L 95%乙腈/水洗涤一次；

(7) 取出合成板，3000 rpm 离心 1 min；

(8) 加入 200 μ L 纯水洗脱液洗脱，收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

实施例 7

本实施例利用不同体积比的氨解液配方进行氨解反应，对比质谱和产量，分析氨解组分对氨解效果的影响。具体实验步骤如下：

(1) 向固相合成柱中加入 20 μ L 氨解液，浸没连接有合成的引物的 CPG，氨解液的配方为异丙胺:叔丁醇:氨基丁醇:Ca(OH)₂ (10 M) 的体积比为 10:5:1:0.01；

(2) 将 20 mL 吡啶倒入规格为 170 mm×130 mm×95 mm 的金属氨解盒中；

(3) 小心将包含多个固相合成柱的合成板放入氨解盒中，静置 1 min，将金属盒盖紧，用螺丝固定密封，保证固相合成柱不接触氨解缓冲液；

(4) 小心将金属氨解盒放入烘箱，45℃加热 35 min，反应结束后，将金属氨解盒取出，放入冰水浴中冷却 10 min；

(5) 取出金属氨解盒，松开螺丝，取出合成板，放入烘箱中 55℃干燥 3 min，取出放凉至室温；

(6) 用 100%乙腈洗涤两次，每次加入 200 μ L，随后用 200 μ L 95%乙腈/水洗涤一次；

(7) 取出合成板，3000 rpm 离心 1 min；

(8) 加入 200 μ L 纯水洗脱液洗脱，收集流出液进行质谱分析和酶标仪定量。

对比例 1

与实施例 2 相比，氨解液的配方为二亚乙基三胺:1 M LiOH 水溶液:乙醇的体积比为 1:3:6，其他条件与实施例 2 相同。对比质谱及产量，分析氨解组分对氨解效果的影响。具体实验步骤为实施例 2 所示步骤。

实施例 2~7 和对比例 1 的引物产量和纯度如表 3 所示，说明使用本氨解配方，对低产量引物（采用 5 nmol 合成）和高产量引物（采用 50 nmol 合成），其产率和纯度都能有所保证，适用范围广；对比例 1 使用的氨解液功效成分二亚乙基三胺和乙醇的氨解活性较弱，因此需要添加高配比的碱性水容易以保证氨解反应发生，但是会造成引物品质差的问题，引物发白严重，杂质较多，且后处理步骤繁琐，影响引物的结构和功能。

表 3 不同氨解条件下 96 条引物的平均产量和纯度

编号	产量 (nmol)	纯度 (%)	外观
实施例 2	3.59	98.9	未见发白现象
实施例 3	35.26	98.5	未见发白现象
实施例 4	36.60	99.4	未见发白现象
实施例 5	33.49	97.6	未见发白现象
实施例 6	35.45	98.8	未见发白现象
实施例 7	34.03	98.0	未见发白现象
对比例 1	33.22	97.8	发白

综上所述，本申请的氨解液配方简洁、成本低廉、环境友好、安全性高，氨解工艺条件温和，不会造成对寡核苷酸结构的破坏，氨解反应在密封容器中发生，避免了氨解液和/或氨解缓冲液的挥发，有助于氨解反应持续进行，氨解效率高，操作简便，氨解缓冲液不仅提供了适宜的氨解环境，而且具有辅助氨解的效果，进一步提高了氨解效率，在核酸的固相合成领域具有重要的应用前景。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法，但本申请并不局限于上述详细方法，即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

权利要求书

- 1、一种氨解液，包括：胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液；
其中所述胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液的体积比为(5~10):(1~5):1:(0.01~0.1)。
- 2、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述胺包括丙胺和/或丁胺。
- 3、根据权利要求2所述的氨解液，其中，所述丙胺包括正丙胺和/或异丙胺。
- 4、根据权利要求2所述的氨解液，其中，所述丁胺包括正丁胺、异丁胺、仲丁胺或叔丁胺中的任意一种或至少两种的组合。
- 5、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述丁醇包括正丁醇、异丁醇、仲丁醇或叔丁醇中的任意一种或至少两种的组合。
- 6、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述氨基醇包括氨基丁醇和/或氨基戊醇。
- 7、根据权利要求6所述的氨解液，其中，氨基戊醇包括5-氨基-1-戊醇和/或4-氨基-1-戊醇。
- 8、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述碱性水溶液包括LiOH水溶液、NaOH水溶液、KOH水溶液、Be(OH)₂水溶液、Mg(OH)₂水溶液或Ca(OH)₂水溶液中的任意一种或至少两种的组合。
- 9、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述碱性水溶液的浓度为1~10 M。
- 10、根据权利要求1所述的氨解液，其中，所述胺、丁醇、氨基醇和碱性水溶液的体积比为(6~8):(2~3):1:(0.04~0.06)。
- 11、根据权利要求8所述的氨解液，其中，所述胺是正丁胺，所述丁醇是正丁醇，所述氨基醇是5-氨基-1-戊醇，并且所述正丁胺、正丁醇、5-氨基-1-戊醇和碱性水溶液的体积比为(5~10):(1~5):1:(0.01~0.1)。
- 12、根据权利要求11所述的氨解液，其中，所述正丁胺、正丁醇、5-氨基-1-戊醇和碱性水溶液的体积比为(6~8):(2~3):1:(0.04~0.06)。
- 13、一种氨解方法，包括以下步骤：
 - (1) 向装有固相载体的固相合成柱中加入权利要求1-12任一项所述的氨解液；
 - (2) 将所述固相合成柱置于装有氨解缓冲液的密封容器内，并保持所述固相合成柱不接触氨解缓冲液；
 - (3) 加热所述密封容器，使固相载体处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中，随后冷却；
 - (4) 从所述密封容器中取出固相合成柱，用洗脱液处理固相合成柱中的固相载体，并收集流出液。
- 14、根据权利要求13所述的方法，其中，步骤(1)所述固相载体包括控制孔径玻璃球。
- 15、根据权利要求13所述的方法，其中，步骤(1)所述固相载体上连接有合成的寡核苷酸。
- 16、根据权利要求13所述的方法，其中，步骤(1)所述氨解液浸没固相载体。
- 17、根据权利要求13所述的方法，其中，步骤(2)所述密封容器包括金属密封盒。
- 18、根据权利要求13所述的方法，其中，步骤(2)所述氨解缓冲液包括氨水和/或有机

胺。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述有机胺包括二乙胺、乙二胺或吡啶中的任意一种或至少两种的组合。

20、根据权利要求 13 所述的方法，其中，步骤（3）所述加热的温度为 45~100℃。

21、根据权利要求 13 所述的方法，其中，步骤（3）所述加热的时间为 30~60 min。

22、根据权利要求 13 所述的方法，其中，步骤（3）所述冷却为冰浴 5~15 min。

23、根据权利要求 13 所述的方法，其中，步骤（4）所述洗脱液包括水和/或 Tris-HCl。

24、根据权利要求 23 所述的方法，其中，所述 Tris-HCl 的浓度为 10~30 mM。

25、根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述 Tris-HCl 的 pH 为 7~8。

26、根据权利要求 13 所述的方法，其中，在步骤（4）所述用洗脱液处理固相合成柱中的固相载体之前，还包括干燥和洗涤所述固相合成柱的步骤。

27、根据权利要求 26 所述的方法，其中，所述干燥为在 50~60℃下处理 1~5 min。

28、根据权利要求 26 所述的方法，其中，所述洗涤采用的洗涤液包括 100%乙腈和/或 80~95%乙腈。

29、根据权利要求 28 所述的方法，其中，所述洗涤包括：将干燥后的固相合成柱依次采用 100%乙腈和 80~95%乙腈洗涤。

30、根据权利要求 26 所述的方法，其中，在洗涤所述固相合成柱之后还包括离心的步骤。

31、根据权利要求 13 所述的方法，其中，所述方法包括以下步骤：

（1）向装有连接了合成的寡核苷酸的控制孔径玻璃球的固相合成柱中加入权利要求 1-12 任一项所述的氨解液，浸没控制孔径玻璃球；

（2）将所述固相合成柱置于装有氨解缓冲液的金属密封容器内，并保持所述固相合成柱不接触氨解缓冲液，所述氨解缓冲液包括氨水和/或有机胺；

（3）将所述金属密封容器在 45~100℃下加热 30~60 min，使连接了合成的寡核苷酸的控制孔径玻璃球处于氨解缓冲液的蒸汽气氛中，随后冰浴冷却 5~15 min；

（4）从所述密封容器中取出固相合成柱，50~60℃下干燥 1~5 min，并依次用 100%乙腈和 80~95%乙腈洗涤，离心后用水和/或 10~25 mM pH 7~8 的 Tris-HCl 处理固相合成柱中的固相载体，并收集流出液。

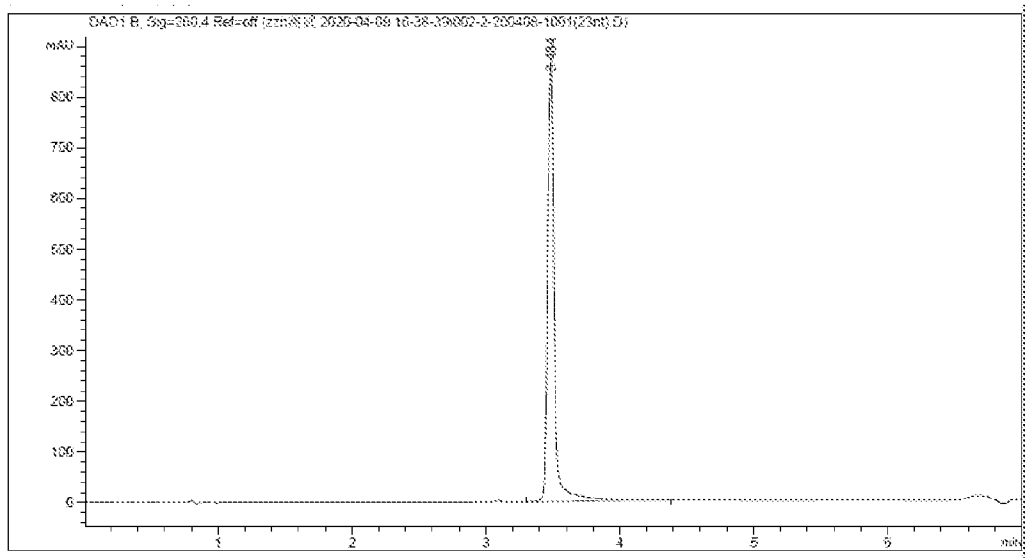


图 1

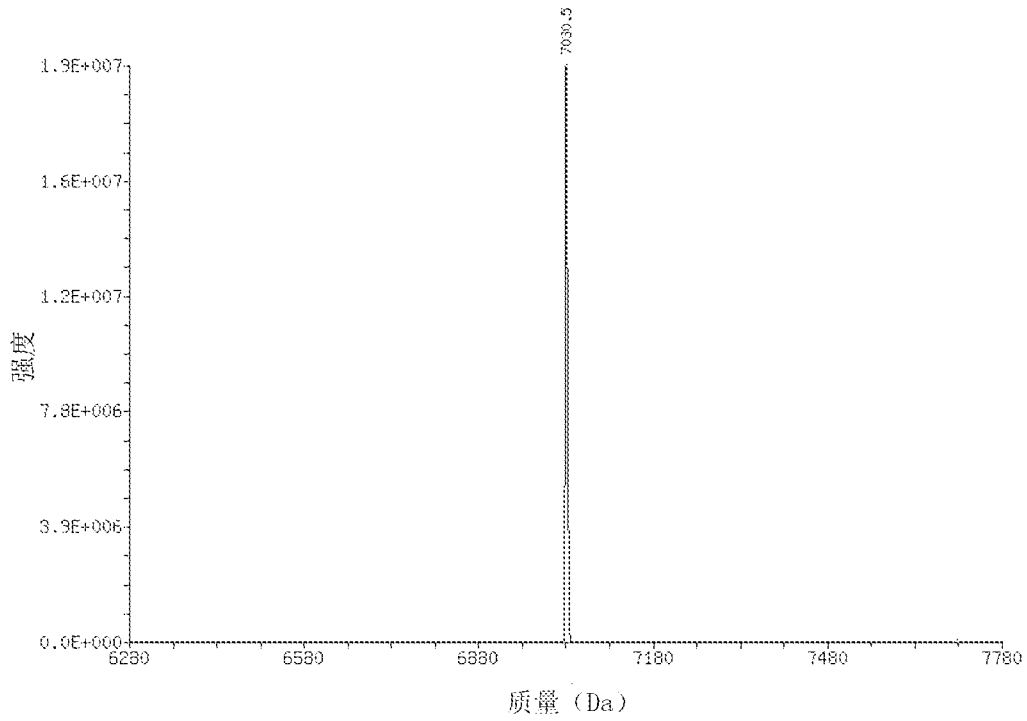


图 2

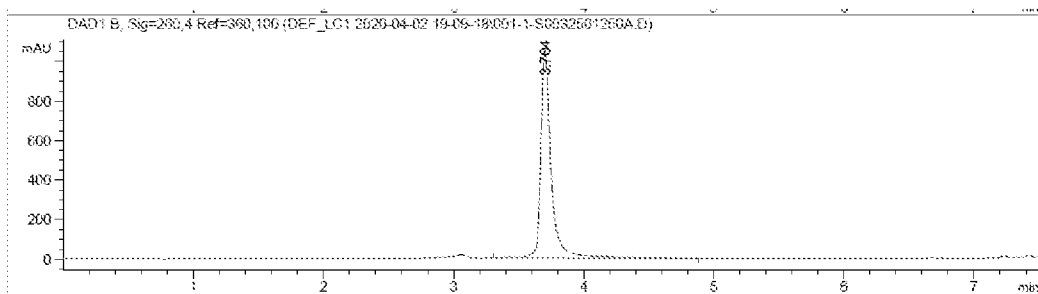


图 3

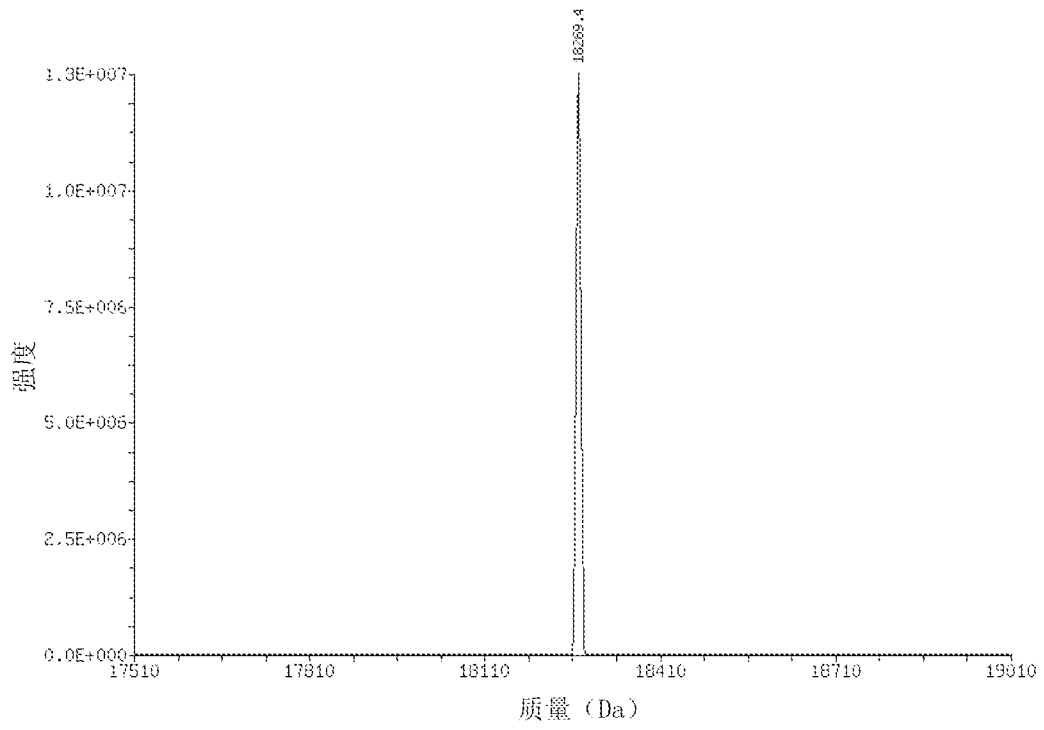


图 4

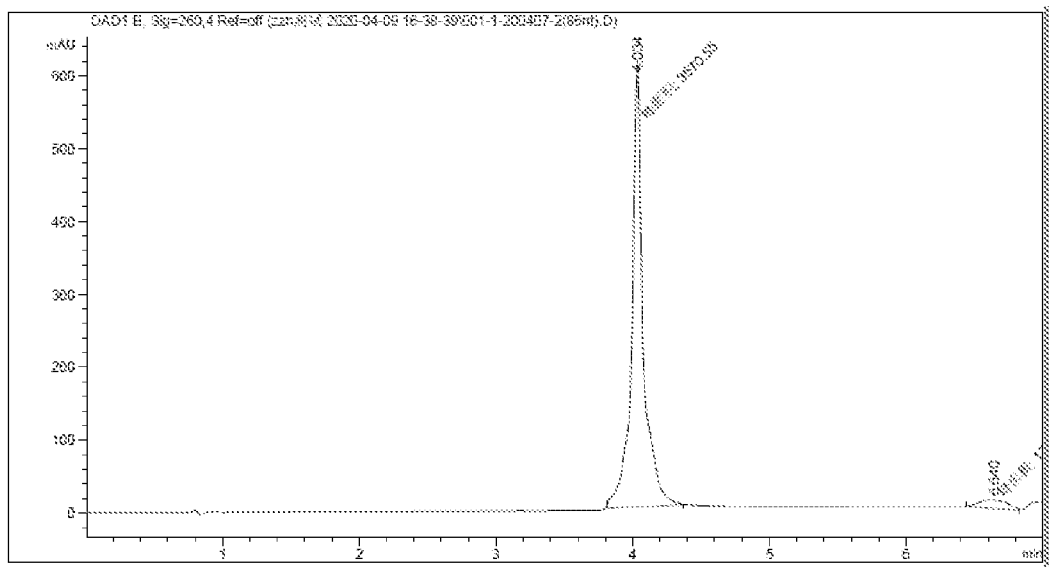


图 5

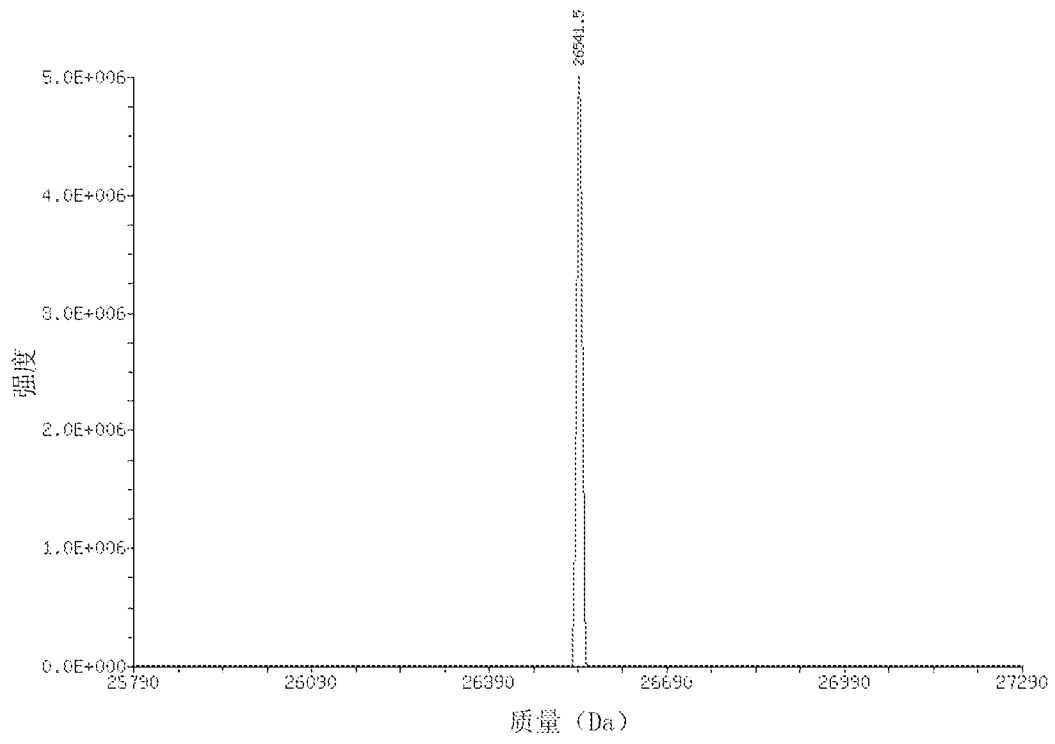


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/125164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H 21/04(2006.01)i; C07H 21/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H 21/- 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) CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, ISI Web of Knowledge, CAPLUS(STN), REGISTRY(STN): 苏州金唯智生物科技有限公司, 曹春艳, 赵双, 靳开宝, 纪磊, 韩承昊, 朱知浩, 寡核苷酸, 固相载体, 氨解, 脱保护, 切割, 脱除, oligonucleot+, +olamine, deprotec+, cleavag+		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111704644 A (SUZHOU GENEWIZ BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 25 September 2020 (2020-09-25) claims 1-31, description paragraphs [0006]-[0069]	1-31
A	CN 109956987 A (GENSCRIPT (NANJING) CO., LTD.) 02 July 2019 (2019-07-02) claims 1, 8, description paragraphs [0030]-[0031], [0047]-[0048], [0059], [0075]-[0083]	1-31
A	WO 2009/140125 A2 (MERCK & CO., INC. et al.) 19 November 2009 (2009-11-19) description page 1 lines 21-24	1-31
A	US 4965349 A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 23 October 1990 (1990-10-23) description column 2 lines 9-15	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2021		Date of mailing of the international search report 27 April 2021
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.

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:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/125164

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	111704644	A	25 September 2020	CN 111704644 B	04 December 2020
CN	109956987	A	02 July 2019	None	
WO	2009/140125	A2	19 November 2009	WO 2009140125 A3	27 June 2013
US	4965349	A	23 October 1990	DE 3856481 T2	18 April 2002
				EP 0323152 B1	15 February 1995
				EP 0617047 A1	28 September 1994
				DE 3853060 T2	19 October 1995
				DE 3856481 D1	23 August 2001
				JP 2787775 B2	20 August 1998
				JP H02796 A	05 January 1990
				EP 0323152 A3	10 April 1991
				EP 0323152 A2	05 July 1989
				DE 3853060 D1	23 March 1995
				EP 0617047 B1	18 July 2001

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/125164

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07H 21/04(2006.01)i; C07H 21/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07H 21/-</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>CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, ISI Web of Knowledge, CAPLUS(STN), REGISTRY(STN):苏州金唯智生物科技有限公司, 曹春艳, 赵双, 靳开宝, 纪磊, 韩承昊, 朱知浩, 寡核苷酸, 固相载体, 氨解, 脱保护, 切割, 脱除, oligonucleot+, +olamine, deprotect+, cleavag+</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 111704644 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2020年 9月 25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-31, 说明书第[0006]-[0069]段</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109956987 A (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2019年 7月 2日 (2019 - 07 - 02) 权利要求1、8, 说明书第[0030] -[0031]、[0047]-[0048]、[0059]、[0075]-[0083]段</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2009/140125 A2 (MERCK & CO., INC.等) 2009年 11月 19日 (2009 - 11 - 19) 说明书第1页第21-24行</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 4965349 A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 1990年 10月 23日 (1990 - 10 - 23) 说明书第2栏第9-15行</td> <td>1-31</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 111704644 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2020年 9月 25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-31, 说明书第[0006]-[0069]段	1-31	A	CN 109956987 A (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2019年 7月 2日 (2019 - 07 - 02) 权利要求1、8, 说明书第[0030] -[0031]、[0047]-[0048]、[0059]、[0075]-[0083]段	1-31	A	WO 2009/140125 A2 (MERCK & CO., INC.等) 2009年 11月 19日 (2009 - 11 - 19) 说明书第1页第21-24行	1-31	A	US 4965349 A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 1990年 10月 23日 (1990 - 10 - 23) 说明书第2栏第9-15行	1-31
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 111704644 A (苏州金唯智生物科技有限公司) 2020年 9月 25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-31, 说明书第[0006]-[0069]段	1-31															
A	CN 109956987 A (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2019年 7月 2日 (2019 - 07 - 02) 权利要求1、8, 说明书第[0030] -[0031]、[0047]-[0048]、[0059]、[0075]-[0083]段	1-31															
A	WO 2009/140125 A2 (MERCK & CO., INC.等) 2009年 11月 19日 (2009 - 11 - 19) 说明书第1页第21-24行	1-31															
A	US 4965349 A (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 1990年 10月 23日 (1990 - 10 - 23) 说明书第2栏第9-15行	1-31															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 4月 12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 4月 27日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)</p> <p>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>马晓婧</p> <p>电话号码 86-(10)-53962166</p>															

第1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:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
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/CN2020/125164

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	111704644	A	2020年 9月 25日	CN	111704644	B	2020年 12月 4日
CN	109956987	A	2019年 7月 2日	无			
WO	2009/140125	A2	2009年 11月 19日	WO	2009140125	A3	2013年 6月 27日
US	4965349	A	1990年 10月 23日	DE	3856481	T2	2002年 4月 18日
				EP	0323152	B1	1995年 2月 15日
				EP	0617047	A1	1994年 9月 28日
				DE	3853060	T2	1995年 10月 19日
				DE	3856481	D1	2001年 8月 23日
				JP	2787775	B2	1998年 8月 20日
				JP	H02796	A	1990年 1月 5日
				EP	0323152	A3	1991年 4月 10日
				EP	0323152	A2	1989年 7月 5日
				DE	3853060	D1	1995年 3月 23日
				EP	0617047	B1	2001年 7月 18日