



国家知识产权局

610000

成都市天府新区华阳华府大道1段1号蓝润ISC2栋1单元2008号 成都天汇致远知识产权代理事务所(普通合伙)
韩晓银(028-87763797)

发文日:

2023年02月24日



申请号: 202010294694.X

发文序号: 2023022400103040

申请人: 西南民族大学

发明创造名称: 检测正呼肠孤病毒的染料荧光定量引物及试剂盒

驳 回 决 定

1. 根据专利法第38条及其实施细则第53条的规定, 决定驳回上述专利申请, 驳回的依据是:

- 申请不符合专利法第2条第2款的规定。
- 申请属于专利法第5条或者第25条规定的不授予专利权的范围。
- 申请不符合专利法第9条第1款的规定。
- 申请不符合专利法第19条第1款的规定。
- 申请不符合专利法第22条的规定。
- 申请不符合专利法第26条第3款或者第4款的规定。
- 申请不符合专利法第26条第5款或者实施细则第26条的规定。
- 申请不符合专利法第31条第1款的规定。
- 申请的修改不符合专利法第33条的规定。
- 申请不符合专利法实施细则第20条第2款的规定。
- 分案申请不符合专利法实施细则第43条第1款的规定。
- _____

详细的驳回理由见驳回决定正文部分(共3页)。

2. 本驳回决定是针对下列申请文件作出的:

- 原始申请文件。
- 分案申请递交日提交的文件。
- 下列申请文件:

申请日提交的摘要附图、说明书摘要、说明书第1-63段、说明书附图; 2022年9月29日提交的权利要求第1-4项。

3. 根据专利法第41条及实施细则第60条的规定, 申请人对本驳回决定不服的, 可以在收到本决定之日起3个月内向专利局复审和无效审理部请求复审。根据专利法实施细则第96条的规定, 复审费应在上述期限内缴纳, 期满未缴纳或者未缴足的, 视为未提出请求。

审查员: 梁欢
联系电话: 028-62968557

审查部门: 专利审查协作四川中心



210407
2022.10

纸件申请, 回函请寄: 100088 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 国家知识产权局专利局受理处收
电子申请, 应当通过电子专利申请系统以电子文件形式提交相关文件。除另有规定外, 以纸件等其他形式提交的文件视为未提交。



驳回决定

申请号：202010294694.X

本决定涉及的是申请号为 202010294694.X 的名称为“检测正呼肠孤病毒的染料荧光定量引物及试剂盒”的发明专利申请，申请人为西南民族大学，申请日为 2020 年 04 月 15 日。

一、案由

本申请原申请文件权利要求书包括 3 项独立权利要求 1、2、4 以及 1 项从属权利要求 3。

应申请人于 2020 年 04 月 15 日提出的实质审查请求，审查员对本申请进行了实质审查。审查员于 2022 年 05 月 25 日发出了第一次审查意见通知书，指出权利要求 1-4 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性，通知书中引用了如下对比文件：

对比文件 1：“Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the lambda3-encoding L1 gene”，Thomas P Leary 等，J Clin Microbiol，第 40 卷第 4 期，第 1368-1375 页，公开日为 20020430；

对比文件 2：“禽呼肠孤病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立”，童桂香等，中国兽医科学，第 37 卷第 09 期，第 767-771 页，公开日为 20071231。

针对该审查意见通知书，申请人于 2022 年 09 月 29 日提交了意见陈述书以及经修改的权利要求书，具体在权利要求 1 中增加了特征“所述引物中 GC% 为 33.3%，引物 3' 端不存在碱基配对， $\Delta G = -0.7 \text{ kcal/mol}$ ”，由于权利要求 1 请求保护的主题是引物，并且已经限定了引物的具体序列，上述特征并不会对引物本身的结构/组成产生影响，因此，新的权利要求 1 与原权利要求 1 请求保护的技术方案实质上相同，已在第一次审查意见通知书中评述过。其意见陈述概述如下：

(1) 本申请的引物中 GC% 为 33.3%，引物 3' 端不存在碱基配对， $\Delta G = -0.7 \text{ kcal/mol}$ ，与对比文件 1 的引物序列不同，且结构存在较大差异，对比文件 1 中 GC 含量在 50% 以上；对比文件 2 的引物序列结构和本申请的引物序列结构也存在较大差异。引物的设计必然都是通过相关设计软件，而在利用这个软件对模板序列进行探索、对二聚体或发夹结构的形成进行探索、以及对目标核苷酸片段的探索本身就是一个创造性劳动过程。

(2) 本申请的引物针对的基因靶标较比现有荧光定量 PCR 的引物针对的基因靶标更为精准：本发明设计的引物是基于 MRV L1 基因，在动物呼肠孤病毒中 L1 序列相对保守，更加适合用做引物的设计靶点。

(3) 引物设计的可检测范围更为广泛：本发明设计的引物是根据国内外公布的所有 MRV 病毒序列，能够同时对国内外现有的毒株进行检测，而设计范围在高度保守的 L1 序列。

(4) 利用该引物，只需要常规的提取核酸，进行反转录后就能进行染料荧光定量 PCR 检测；整个扩增只需要 2 h 即可完成，检测的灵敏度达到 $7.58 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。阳性结果鉴定便捷，只需要判断其 CT 值是否小于“35”即可；比现有检测 MRV 的核酸电泳或荧光定量 PCR 的方法更加快捷、准确。

审查员认为，本案事实已经清楚，因此针对申请日提交的说明书、说明书摘要、摘要附图、说明书附图；2022 年 9 月 29 日提交的权利要求第 1-4 项作出本驳回决定。

二、驳回理由

(一) 创造性问题

1、权利要求 1 请求保护一种染料荧光定量 RT-PCR 引物。需要说明的是，权利要求 1 中明确限定了具体的引物序列 SEQ ID NO.1-2，进一步限定的“所述引物中 GC% 为 33.3%，引物 3' 端不存在碱基配对， $\Delta G = -0.7 \text{ kcal/mol}$ ”这一特征并不会对引物本身的结构/组成产生影响。根据说明书的记载可知，权利要求 1 所述引物 (SEQ ID NO.1-2) 是针对呼肠孤病毒 (Reovirus) 的 L1 基因设计的特异性检测引物。对比文件 1



（“Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the lambda3-encoding L1 gene”，Thomas P Leary 等，J Clin Microbiol，第 40 卷第 4 期，第 1368-1375 页，公开日为 20020430）作为最接近的现有技术，其公开了（参见摘要，“Oligonucleotide primers”、“Agarose gel electrophoresis and sequencing of PCR products”部分）采用巢式 PCR 方法检测呼肠孤病毒，其具体针对呼肠孤病毒 L1 基因设计了两对特异性引物 L1.rv5、L1.rv6 和 L1.rv7、L1.rv8，通过 PCR 产物结果判断是否为呼肠孤病毒阳性。对比文件 1 与权利要求 1 相比，其区别技术特征在于：本申请仅涉及一对引物，且引物序列不同。基于上述区别技术特征，权利要求 1 实际解决的技术问题是提供可定量鉴定呼肠孤病毒的检测引物。

针对上述区别技术特征，对比文件 2（“禽呼肠孤病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立”，童桂香等，中国兽医科学，第 37 卷第 09 期，第 767-771 页，公开日为 20071231）公开了（参见摘要）禽呼肠孤病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法，具体地，根据 S1 基因 σC 结构蛋白基因保守区域序列设计了 1 对特异性引物，以体外转录的 RNA 作为标准品，应用 SYBR Green I 染料法建立了检测禽呼肠孤病毒的一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法。即对比文件 2 给出了可以针对靶标保守区域设计一对特异性引物，通过染料荧光定量 RT-PCR 方法完成靶标定量检测的技术启示，因此，本领域技术人员为了对呼肠孤病毒进行定量检测，容易想到针对呼肠孤病毒 L1 基因设计一对特异性引物应用于染料荧光定量 RT-PCR 方法中，实现对呼肠孤病毒的定量检测，具体可借助引物设计软件辅以合理有限的试验确认适宜的引物序列。

因此，在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 以及本领域技术人员常规技术手段得到权利要求 1 请求保护的技术方案对于本领域技术人员而言是显而易见的。权利要求 1 不具有突出的实质性特点和显著的进步，不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

2、权利要求 2 请求保护一种染料荧光定量 RT-PCR 试剂盒，其特征在于：该试剂盒包括权利要求 1 所述的染料荧光定量 RT-PCR 引物。参见对权利要求 1 的评述意见，权利要求 1 所述的染料荧光定量 RT-PCR 引物对于本领域技术人员而言是显而易见，出于方便使用、运输等目的，本领域技术人员容易想到制备相应的检测试剂盒，并将检测引物纳入其中。因此，在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 以及本领域技术人员常规技术手段得到权利要求 2 请求保护的技术方案对于本领域技术人员而言是显而易见的。权利要求 2 不具有突出的实质性特点和显著的进步，不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

3、权利要求 3 引用权利要求 2，进一步限定了试剂盒中包含的其他物质。对比文件 2 中还公开了制备质粒标准品，进行一步法荧光 RT-PCR 反应等过程（参见第 1.5、1.6 节），本领域技术人员在此基础上容易想到在采用染料荧光定量 RT-PCR 检测靶标时，需要用到基因扩增试剂、PCR 纯化试剂、质粒提取试剂等，因此，本领域技术人员能够想到在权利要求 2 所述的染料荧光定量 RT-PCR 试剂盒中同时纳入基因扩增试剂、PCR 纯化试剂、质粒提取试剂以方便使用。因此，当其引用的权利要求不具备创造性时，该权利要求也不具有突出的实质性特点和显著的进步，不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

4、权利要求 4 请求保护权利要求 1 所述的染料荧光定量 RT-PCR 引物、或者权利要求 2 或 3 所述的染料荧光定量 RT-PCR 试剂盒在检测哺乳动物正呼肠孤病毒中的应用。参见对权利要求 1 的评述，权利要求 1 所述的染料荧光定量 RT-PCR 引物是针对呼肠孤病毒（即哺乳动物正呼肠孤病毒）的特异性检测引物，且权利要求 2-3 所述的试剂盒均包含权利要求 1 所述的引物；将检测哺乳动物正呼肠孤病毒的特异性引物或包含该引物的试剂盒用于检测哺乳动物正呼肠孤病毒是本领域技术人员的惯用手段。因此，在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 以及本领域技术人员常规技术手段得到权利要求 4 请求保护的技术方案对于本领域技术人员而言是显而易见的。权利要求 4 不具有突出的实质性特点和显著的进步，不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

（二）申请人的意见陈述不具有说服力，理由如下：



(1) 首先, 本领域技术人员熟练掌握 PCR 引物的设计, 知晓其通常的设计原则, 例如 GC 含量一般为 40-60%, 引物 3' 端不存在碱基配对 (否则容易引起二聚体), 引物 ΔG 最好呈正弦曲线性状, 即 5' 端和中间 ΔG 值较高, 而 3' 端 ΔG 相对较低; 因此, 本申请的引物 3' 端不存在碱基配对是引物设计的基本要求, ΔG 也是符合本领域常规设计范围的。对于本申请引物的 GC 含量, 其下游引物 19bp、GC% 为 53.6%, 上游引物 24bp、GC% 为 33.3%, 而本领域技术人员知晓, GC 含量低会导致 T_m 较低, 较低的温度不利于提高 PCR 的特异性, 但是可以通过适当延长引物的长度以达到特异性检测, 因此, 本申请的下游引物长度和 GC 含量也是可合理设计的, 且本申请引物的较低 GC 含量也未能给本发明带来任何预料不到的技术效果。对于引物的设计, 现有技术中可用的核酸数据库、核酸序列比对软件和引物设计软件为解决这一类技术问题提供了极大便利, 在确定了靶基因的情况下 (对比文件 1 给出了以 L1 基因为靶标的技术启示), 可以将同一物种的靶基因序列进行多重比对后发现其保守区, 然后基于保守区设计候选引物对, 通常情况下结合合理的分子生物学实验即容易筛选到合适的引物, 即使引物筛选过程中存在大量重复性劳动, 但是其主要起辅助验证的作用, 是引物开发过程中必然涉及的常规工作量, 不能为本发明带来创造性。

(2) 参见对权利要求 1 的评述意见, 对比文件 1 已经公开了针对 MRV 的 L1 基因设计特异性检测引物, 通过 PCR 产物结果判断是否为呼肠孤病毒阳性; 在此基础上, 本领域技术人员能够想到动物呼肠孤病毒中 L1 序列具有作为特异性引物靶点的潜力, 有能力以此为靶点设计其他 PCR 检测引物。

(3) 首先, 参见对比文件 1 的表 1, 对比文件 1 的引物也可以检测多个地域的 MRV 病毒; 其次, 通过将对比文件 1 中的引物序列 (L1.rv5、L1.rv6 和 L1.rv7、L1.rv8) 与本申请的引物序列 (MRV F、MRV R) 分别置于 Primer-BLAST 中, 进行比对发现, 两者的引物序列均与多种国内外公布的 MRV 病毒 L1 基因序列匹配, 即, 本领域技术人员可以合理预期, 对比文件 1 的引物也能够同时对国内外的毒株进行检测, 且设计范围在 L1 序列上。

(4) 参见对权利要求 1 的评述意见, 对比文件 1 公开了采用巢式 PCR 方法检测呼肠孤病毒, 其具体针对呼肠孤病毒 L1 基因设计了两对特异性引物, 通过 PCR 产物结果判断是否为呼肠孤病毒阳性; 对比文件 2 公开了采用实时荧光定量 RT-PCR 检测禽呼肠孤病毒, 具体地, 根据 S1 基因 σC 结构蛋白基因保守区域序列设计了 1 对特异性引物, 以体外转录的 RNA 作为标准品, 应用 SYBR Green I 染料法建立了检测禽呼肠孤病毒的一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法; 本领域技术人员为了对呼肠孤病毒进行定量检测, 容易想到针对对比文件 1 中公开的呼肠孤病毒保守基因 L1 基因设计一对特异性引物应用于染料荧光定量 RT-PCR 方法中, 实现对呼肠孤病毒的定量检测。而且, 本领域技术人员熟练掌握荧光定量 PCR 技术, 知晓其一般的扩增过程、时间以及可通过 Ct 值判定结果等; 对于扩增时间, 可参见对比文件 2 公开的一步法荧光 RT-PCR 反应时间为 37min (反转录反应: 42°C 15 min, 95°C 2 min; PCR 反应: 40 个循环, 95°C 5s, 60°C 10s, 72°C 10s, 77°C 5s, 收集荧光信号); 即本申请的整个扩增在 2h 内完成完全在本领域技术人员合理预期的范围内。对于灵敏度, 对比文件 1 中公开了其检测灵敏度可达检测到单个病毒颗粒; 对比文件 2 中公开了其检测灵敏度达 5.2×10^2 个拷贝; 因此, 本申请的检测灵敏度也在本领域技术人员合理预期的范围内, 不能给本申请带来创造性。

三、决定

综上所述, 本发明专利申请不符合专利法第 22 条第 3 款的规定, 属于专利法实施细则第 53 条第 (2) 项的情况, 因此根据专利法第 38 条予以驳回。

根据专利法第 41 条第 1 款的规定, 申请人如果对本驳回决定不服, 可以在收到本驳回决定之日起 3 个月内, 向专利局复审和无效审理部请求复审。

审查员姓名: 梁欢
审查员代码: 30140985