



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09月16日



申请号: 201910300322.0

发文序号: 2023091600252940

申请人: 西南民族大学

发明创造名称: 一种绵羊肺炎支原体间接血凝检测方法的建立方法

第二次审查意见通知书

1. ☒ 审查员已经收到申请人于 2023 年 06 月 27 日提交的意见陈述书,在此基础上审查员对上述专利申请继续进行实质审查。

☐ 根据国家知识产权局于 _____ 年 _____ 月 _____ 日作出的复审决定,审查员对上述专利申请继续进行实质审查。

☐ _____

2. ☐ 经审查,申请人于 _____ 提交的修改文件,不符合专利法实施细则第 51 条第 3 款的规定,不予接受。

3. 继续审查是针对下列申请文件进行的:

☐ 上述意见陈述书中所附的经修改的申请文件。

☒ 前次审查意见通知书所针对的申请文件以及上述意见陈述书中所附的经修改的申请文件替换文件。

☐ 前次审查意见通知书所针对的申请文件。

☐ 上述复审决定所确定的申请文件。

☐ _____

4. ☒ 本通知书未引用新的对比文件。

☐ 本通知书引用下列对比文件(其编号续前,并在今后的审查过程中继续沿用):

编号	文件号或名称	公开日期 (或抵触申请的申请日)
----	--------	---------------------

5. 审查的结论性意见:

关于说明书:

☐ 申请的内容属于专利法第 5 条规定的不授予专利权的范围。

☐ 说明书不符合专利法第 26 条第 3 款的规定。

☐ 说明书的修改不符合专利法第 33 条的规定。

☐ 说明书的撰写不符合专利法实施细则第 17 条的规定。

☐ _____

关于权利要求书:

☐ 权利要求 _____ 不符合专利法第 2 条第 2 款的规定。

☐ 权利要求 _____ 不符合专利法第 9 条第 1 款的规定。



国家知识产权局

- ☐ 权利要求_____不具备专利法第 22 条第 2 款规定的新颖性。
- ☒ 权利要求 1-6 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。
- ☐ 权利要求_____不具备专利法第 22 条第 4 款规定的实用性。
- ☐ 权利要求_____属于专利法第 25 条规定的不授予专利权的范围。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法第 26 条第 4 款的规定。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法第 31 条第 1 款的规定。
- ☐ 权利要求_____的修改不符合专利法第 33 条的规定。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法实施细则第 19 条的规定。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法实施细则第 20 条的规定。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法实施细则第 21 条的规定。
- ☐ 权利要求_____不符合专利法实施细则第 22 条的规定。
- ☐ _____

- ☐ 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 19 条第 1 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。

上述结论性意见的具体分析见本通知书的正文部分。

6. 基于上述结论性意见, 审查员认为:

- ☐ 申请人应当按照通知书正文部分提出的要求, 对申请文件进行修改。
- ☐ 申请人应当在意见陈述书中论述其专利申请可以被授予专利权的理由, 并对通知书正文部分中指出的不符合规定之处进行修改, 否则将不能授予专利权。
- ☒ 专利申请中没有可以被授予专利权的实质性内容, 如果申请人没有陈述理由或者陈述理由不充分, 其申请将被驳回。
- ☐ _____

7. 申请人应注意下列事项:

(1) 根据专利法第 37 条的规定, 申请人应在收到本通知书之日起的 2 个月内陈述意见, 如果申请人无正当理由逾期不答复, 其申请被视为撤回。

(2) 申请人对其申请的修改应当符合专利法第 33 条的规定, 不得超出原说明书和权利要求书记载的范围, 同时申请人对专利申请文件进行的修改应当符合专利法实施细则第 51 条第 3 款的规定, 按照本通知书的要求进行修改。

(3) 申请人的意见陈述书和/或修改文本应当邮寄或递交国家知识产权局专利局受理处, 凡未邮寄或递交给受理处的文件不具备法律效力。

(4) 未经预约, 申请人和/或代理师不得前来国家知识产权局与审查员举行会晤。

8. 本通知书正文部分共有 5 页, 并附有下列附件:

- ☐ 引用的对比文件的复印件共_____份_____页。
- ☒ 引用的现有技术证据复印件共 1 份 4 页。

审查员: 赵晓明

联系电话: 020-28950824

审查部门: 专利审查协作广东中心



210403
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。



第二次审查意见通知书

申请号:2019103003220

申请人于 2023 年 06 月 27 日提交了意见陈述书和经过修改的申请文件,审查员在阅读了上述文件后,对本案继续审查,再次提出如下审查意见。

权利要求 1-6 不具备专利法第二十二条第三款规定的创造性

1.权利要求 1 请求保护一种非疾病诊断目的的绵羊肺炎支原体间接血凝检测方法的建立方法。然而,对比文件 1 (“应用间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体血清抗体”,屈勇刚等,中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第六届全国会员代表大会暨第 11 次学术研讨会论文集,第 998-1001 页,2005 年 09 月)公开了应用间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体血清抗体,其中具体公开了如下内容:

2.3 支原体的浓缩及纯化 Mo 生长期的培养物经镜检合格后取 100ml,1000r/min 离心 20min,取出上清液 10℃下 8000r/min 离心 30min,收集沉淀,用 PH7.2 的磷酸盐缓冲溶液充分洗涤,如此离心、沉淀、洗涤 3 次后,制成 1/100 的浓缩抗原,经紫外分光光度法及计算所得菌体蛋白浓度。

2.4 抗原的制备 将浓缩的菌体悬液与一定量的稀释液混匀后,用超声波细胞粉碎机处理 10min 即成所需抗原,冰冻保存。

2.5 绵羊红细胞的制备 无菌采取健康绵羊的颈静脉血液与等量的抗凝液充分混匀,置 4℃冰箱中稳定 12h,以 3000r/min 离心 15min 弃去上清液,用 PH7.2 的磷酸盐缓冲溶液充分洗涤,如此离心、沉淀、洗涤 3 次后,配成 5%的绵羊红细胞悬液 4℃冷藏备用。

2.6 红细胞的醛化 取制备的绵羊红细胞悬液与 4℃下保存的 2.5%戊二醛溶液,按 5:1 逐滴加入,置磁力搅拌器上室温下搅拌醛化 2h,3000r/min 离心 15min 弃去上清液,用 PH7.2 的磷酸盐缓冲溶液充分洗涤,如此离心、沉淀、洗涤 3 次后,将醛化的红细胞配成 5%的绵羊红细胞悬液,4℃冷藏备用。



2.7 醛化红细胞的致敏 取一份 5%的醛化红细胞悬液与一份超声波破碎的抗原,在 37℃水浴锅中感作 30min,期间不断轻轻摇振充分感作。最后以 3000r/min 离心 10min 弃去上清液,用 PH7.2 的磷酸盐缓冲溶液充分洗涤,如此离心、沉淀、洗涤 3 次后,用 10ml/L 小牛血清 PBS 将致敏的红细胞配成 1%的悬液,4℃冷藏备用。

2.8 IHA 试验

2.8.1 抗体效价的测定 用微量移液器吸取 PH7.2 的 PBS 稀释剂 25 μ L 滴于 96 孔“V”型微量反应板孔中,用微量稀释管取阴性血清 25 μ L 于反应板的第一孔,然后依次作对比稀释至第 11 孔,每孔加 25 μ L 的致敏红细胞悬液,第 12 孔为空白对照仅加 PBS 稀释剂;阳性血清方法同阴性血清,在震荡器上微震使其充分混匀,在 37℃下孵育 40min 后观察结果。用“—”、“+”、“++”、“+++”、“++++”表示红细胞的凝集强度,出现“++”的血清最高稀释倍数为该血清的血凝效价。

2.8.2 抗原最佳浓度测定 将抗原稀释成 7.8125 μ g/ml、15.625 μ g/ml、62.5 μ g/ml 的三组,分别致敏红细胞作 IHA 的对比试验,根据凝集程度来确定适宜的抗原浓度。

2.8.3 稀释剂对比试验 将 PH7.2 的 PBS 与含 1%小牛血清的 PH7.2 的 PBS 分别作为 IHA 试验的稀释液进行对比,观察结果,挑选出稳定、凝集现象明显的稀释剂。……当稀释剂为 PBS、抗原浓度为 15.625 μ g/ml 时出现最佳凝集,血凝效价随抗原浓度的升高而升高,但是当抗原浓度超过 15.625 μ g/ml 时血凝效价不再明显升高,所以可以确定适宜的抗原浓度为 15.625 μ g/ml,用此浓度抗原制备的致敏红细胞血凝效价较高而且稳定。……上述试验可以看出当抗原浓度为 15.625 μ g/ml,稀释剂为 1%小牛血清的 PH7.2 的 PBS 时,相对于 PH7.2 的 PBS 具有凝集效果明显、无特异性的凝集反应、效价稳定等特点(参见第 998—1001 页)。

权利要求 1 所述技术方案与对比文件 1 的区别技术特征在于,权利要求 1 中具体细节参数、步骤不同于对比文件 1。基于上述区别技术特征,本申请实际解决的技术问题是,如何更为简便且安全的对绵羊肺炎支原体进行检测。



然而，对比文件 2（“绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的表达及其免疫原性”，杨发龙等，中国兽医科学，第 43 卷第 07 期，第 733–737 页，2013 年）公开了绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的表达及其免疫原性，其中具体公开了，本研究成功克隆了编码绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的基因片段，并成功在大肠杆菌中以可溶的形式得到表达。利用兔抗绵羊肺炎支原体全菌抗体进行免疫印迹分析，结果表明纯化得到的重组蛋白能与全菌抗体特异性结合，表明用绵羊肺炎支原体免疫家兔后，家兔能产生针对 P113 蛋白的抗体。这同时也说明本研究所表达的重组蛋白可以作为抗原，在 ELISA 等绵羊肺炎支原体血清抗体检测试剂盒的研制和亚单位疫苗的开发等方面具有潜在的应用价值（参见第 733–737 页）。由此可见，对比文件 2 教导了 P113 的重组蛋白可用于血清抗体的检测，且本领域技术人员所公知的是，重组抗原较对比文件 1 中支原体处理方法具有更为安全和便捷的优势，因而，当面对如何更为简便且安全的对绵羊肺炎支原体进行检测的技术问题时，本领域技术人员有动机利用对比文件 2 中重组蛋白替代对比文件 1 中支原体抗原，并依据具体实验条件、操作习惯等“使用不同重组蛋白稀释浓度的绵羊肺炎支原体抗原致敏红细胞测定同一批血清的 IHA 血清效价，并确定最高血清效价所对应的抗原稀释度”。而对于绵羊红细胞的制备、致敏方法中的具体参数，本领域技术人员可以依据具体实验条件、操作习惯等进行调整，通过有限的实验确定较佳值，其并不需要付出创造性劳动，也并不会带来预料不到的技术效果。

因此，在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 以及本领域的公知常识、常规技术手段，得到权利要求 1 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 所述技术方案不具有突出的实质性特点和显著的进步，不具备专利法第二十二条第三款规定的创造性。

2. 权利要求 2–5 分别对权利要求 1 作了进一步限定，然而，对比文件 1 公开了，用微量移液器吸取 PH7.2 的 PBS 稀释剂 25 μ L 滴于 96 孔“V”型微量反应板孔中，用微量稀释管取阴性血清 25 μ L 于反应板的第一孔，然后依次作对比稀释至第 11 孔，每孔加 25 μ L 的致敏红细胞悬



液，第 12 孔为空白对照仅加 PBS 稀释剂；阳性血清方法同阴性血清，在震荡器上微震使其充分混匀，在 37℃ 下孵育 40min 后观察结果。……2.8.2 抗原最佳浓度测定 将抗原稀释成 7.8125 μ g/ml、15.625 μ g/ml、62.5 μ g/ml 的三组，分别致敏红细胞作 IHA 的对比试验，根据凝集程度来确定适宜的抗原浓度（参见第 999–1000 页）。而对于绵羊红细胞致敏、间接血凝检测方法中的具体参数，本领域技术人员可以依据具体实验条件、操作习惯等进行调整，通过有限的实验确定较佳值，其并不需要付出创造性劳动，也并不会带来预料不到的技术效果。因此，在权利要求 1 不具备创造性的前提下，权利要求 2–5 也不具备专利法第二十二条第三款规定的创造性。

3. 权利要求 6 请求保护一种权利要求 1–5 中任一权利要求所述的方法建立的绵羊肺炎支原体间接血凝检测方法在绵羊肺炎支原体检测中的应用。然而，参见本次审查意见通知书关于权利要求 1–5 的评述可知，权利要求 1–5 并不具备创造性，而对比文件 1（“应用间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体血清抗体”）进一步公开了，用绵羊肺炎支原体（MoY-98）致敏经戊二醛醛化处理的绵羊红细胞，制备成间接血凝试验（IHA）的诊断抗原，通过 IHA 来检测绵羊支原体性肺炎血清抗体。发现致敏红细胞所用抗原的最佳浓度为 15.625 ~ 62.500 μ g/mL；对于感染绵羊血清阳性检出率达 100%（6/6），送检血清的阳性检出率为 69.97%（参见第 998–1001 页）。因此，在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 以及本领域的公知常识、常规技术手段，得到权利要求 6 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 6 所述技术方案不具有突出的实质性特点和显著的进步，不具备专利法第二十二条第三款规定的创造性。

申请人意见：

修改后的权利要求 1 与对比文件 1 的区别在于：步骤 1）中的制备绵羊肺炎支原体抗原具体为：诱导表达纯化绵羊肺炎支原体黏附素基因 p113 的 C 端重组蛋白工程菌，作为抗原，所述抗原的蛋白浓度为 164 μ g/ml；所述步骤 2）中的制备绵羊红细胞具体为：无菌采取健康绵羊颈静脉血等体积加入灭菌的阿氏液，置于 4℃ 冰箱静置，之后用纱布过滤，3000rpm\min 离心



10min, 弃去上清, 反复洗涤 5 次, 配制成 5% 的红细胞悬液; 将 5% 红细胞悬液于磁力搅拌器上以低转速进行搅拌, 并且逐滴加入 1/5 体积的 2.5% 的戊二醛, 醛化 5 个小时。取 1: 20 000 鞣酸加入到等体积的 5% 的醛化红细胞悬液中震荡混匀, 37℃ 孵育 30 min, 用 pH6.4 的 PBS 洗涤 3 次, 洗涤完毕后, 用 pH7.2 的 PBS 恢复到原体积, 制备得到浓度为 5% 的绵羊红细胞; 对绵羊红细胞进行致敏处理具体为: 以 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 共 5 个稀释度用来稀释抗原, 让其分别与等量 5% 醛化鞣酸化红细胞混合, 37℃ 水浴致敏 60 min, 用含 1% BSA 的 0.15 mol/L pH7.2 的 PBS 洗 2 次后, 再用此稀释液配成 1% 的致敏红细胞悬液, 用此五个浓度抗原致敏的红细胞分别检测绵羊肺炎支原体的阳性血清。

本发明通过克隆表达绵羊肺炎支原体黏附素基因 p113 的 C 端重组蛋白, 并以该蛋白作为抗原致敏健康绵羊红细胞, 通过筛选抗原的最佳致敏浓度, 以及最适的反应条件, 建立特异性强, 敏感性好, 符合率高的绵羊肺炎支原体间接血凝检测方法; 该方法将操作简单不借助特殊设备, 可以实现基层工作的快速检测, 为疫病防控提供有力工具。使用间接血凝与绵羊肺炎支原体全菌蛋白包被间接 ELISA 方法检测结果做对比时, 在对 8 份健康未感染血清进行检测时, 间接血凝检出 0 份阳性, ELISA 方法检出 0 份阳性; 对 50 份感染阳性血清进行检测时, 间接血凝方法检出 49 份阳性, ELISA 方法检出 46 份阳性; 对比两种方法其敏感性为 93.88%, 诊断符合率为 91.66%, 假阳性率为 18.18%, 假阴性率为 6.12%。对比文件 1 (“应用间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体血清抗体”, 屈勇刚等, 中国畜牧兽医学会家畜传染病学分会第六届全国会员代表大会暨第 11 次学术研讨会论文集, 第 998-1001 页, 2005 年 09 月) 没有公开上述区别技术特征和技术效果, 因此, 修改后的权利要求 1 相对于对比文件 1 具有预料不到的技术效果。对比文件 2 (“绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的表达及其免疫原性”, 杨发龙等, 中国兽医科学, 第 43 卷第 07 期, 第 733-737 页, 2013 年) 也没有公开上述区别技术特征和技术效果, 因此, 修改后的权利要求 1 相对于对比文件 2 具有预料不到的技术效果。且上述区别技术特征也



不是本领域的公知常识，因此修改后的权利要求 1 相对于对比文件 1 和 2 以及公知常识具有突出的实质性特点和显著的进步，因而具有创造性。

审查员意见：

审查员对申请人的意见进行了充分的考虑，进一步提出如下意见。

第一、申请人指出，在对 8 份健康未感染血清进行检测时，间接血凝检出 0 份阳性，ELISA 方法检出 0 份阳性；对 50 份感染阳性血清进行检测时，间接血凝方法检出 49 份阳性，ELISA 方法检出 46 份阳性；对比两种方法其敏感性为 93.88%，诊断符合率为 91.66%，假阳性率为 18.18%，假阴性率为 6.12%。修改后的权利要求 1 相对于对比文件 1 具有预料不到的技术效果。对此，审查员认为，对比文件 1 中明确的公开了，对于感染绵羊血清阳性检出率达 100%（6/6）（参见摘要）。由此可见，作为现有技术的对比文件 1 已经能够获得较优的技术效果。本申请相对于对比文件 1 主要区别采用 p113 的 C 端重组蛋白作为抗原致敏绵羊红细胞。而对比文件 2 中教导了，经纯化的重组蛋白与抗绵羊肺炎支原体全菌血清发生结合反应，表明 P113 的 C 端蛋白是良好的免疫原。因而，本领域技术人员为了实验安全有动机采用 P113 的 C 端蛋白致敏绵羊红细胞进而进行间接血凝检测。

第二、对比文件 1 以及第一次审查意见通知书所附检索报告中文件“绵羊肺炎支原体间接血凝诊断方法的建立”、CN104062439A 中均教导了如何对间接血凝检测方法中细节参数、步骤进行优化，在此基础上，本领域技术人员得到本申请权利要求中细节参数，其并不需要克服技术困难。

基于上述理由，本申请不能被授予专利权，而且本申请的说明书中也没有记载其它任何可获得专利权的实质性内容，因而即使对申请文件进行修改，本申请也不具备被授予专利权的前景。如果申请人不能在本通知书规定的答复期限内提出具有说服力的理由，本申请将被驳回。



审查员姓名:赵晓明

审查员代码:30101302

210403
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。