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(028-85961062)

发文日：

2023年07月27日

申请号：202210535082.4 **发文序号：** 2023072700031390

申请人：四川农业大学

发明创造名称：一种水稻雄性育性控制基因 STS1、其编码蛋白及应用

第 二 次 审 查 意 见 通 知 书

1.☒审查员已经收到申请人于 2023 年 07 月 24 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。

☐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 1-9 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 3 页，并附有下列附件：

☐引用的对比文件的复印件共________份________页。
☐________

审查员：蒲恒　　联系电话：028-62968591　　审查部门：专利审查协作四川中心

国家知识产权局 专利审查业务章

第二次审查意见通知书

申请号:2022105350824

申请人于 2023 年 07 月 24 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，对本案继续进行审查，再次提出如下审查意见。

一. 权利要求 1-9 不符合专利法第 22 条第 3 款的规定。

1. 权利要求 1 请求保护一种水稻雄性育性控制基因 STS1 突变体。

对比文件 2（CN114262699A，公开日为 20220401）公开了水稻雄性不育基因 OsLDDT1，其 cDNA 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示（参见说明书第[0043]段）。经序列比对，其核苷酸序列与本申请 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的同源性为 99.7%，即，对比文件 2 所述水稻雄性不育基因 OsLDDT1 与本申请 SEQ ID NO.1 所示的水稻雄性育性控制基因 STS1 为序列相似度极高且功能相同的同源基因。根据本申请说明书的记载，SEQ ID NO.6-9 任一所示的核苷酸序列为本申请 SEQ ID NO.1 所示的水稻雄性育性控制基因 STS1 突变后的基因组序列。由此可见，权利要求 1 与对比文件 2 相比，区别特征在于：基因序列不同。基于以上区别特征，权利要求 1 实际解决的技术问题是：提供水稻雄性不育基因 OsLDDT1 的同源基因突变后的基因组序列。

对于上述区别特征，对比文件 2 还公开了：本发明实施例 1 中 OsLDDT1 基因第 5416bp 位碱基缺失突变后，造成水稻基因 OsLDDT1 发生移码突变，编码蛋白提前转录终止，使基因 OsLDDT1 功能丧失（参见说明书第[0043]段）。本发明首次揭示了水稻基因 OsLDDT1 具有调控植物雄性育性的生物学功能。基于图位克隆和功能互补实验在水稻中验证了该基因的功能，用 pCAMBIA1300-OsLDDT1 功能互补载体转化突变体 lddt1 后，转基因植株雄配子育性恢复，即 OsLDDT1 基因功能丧失型突变导致雄性部分败育而功能互补该基因育性恢复正常。本发明水稻 OsLDDT1 基因功能丧失后完全败育；lddt1 突变体绒毡层降解和花粉囊壁的分化和退化进程均发生了延迟，最终导致其无成熟花粉和小穗完全不育；构建并测序验证成功的 pCAMBIA1300-OsLDDT1 的载体，转化到突变体 lddt1 后获得转基因植株，经潮霉素鉴定为阳性的植株正常种植于大田，于抽穗开花期取样观察发现，转基因植株的花药转变为乳黄色，花粉育性大于 80%。待灌浆至完全成熟，发现其小穗育性和结实率已基本与野生型相同这些表型进一步证明 ORF4 即为控制本研究中 lddt1 突变体花药发育畸形、无花粉的雄性不育基因（参见摘要，实施例 1-7）。可见，对比文件 2 公开了所述基因 OsLDDT1 为水稻雄性育性调控基因，该基因突变导致水稻雄性不育。因而，结合上述技术信息的教导，当需要提供水稻雄性不育基因 OsLDDT1 的同源基因突变后的基因组序列时，本领域技术人员容易想到根据对比文件 2 所述的水稻雄性不育基因 OsLDDT1 的序列结构设计引物，从常规水稻品种日本晴中扩增获得其同源基因，进而突变该同源基因以获得其突变后的基因组序列（如 SEQ ID NO.6-9 任一所示的突变体）以及相应的水稻雄性不育材料，并具备能力通过常规技术手段加以实施和验证。

因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 1 请求保护的技术方案对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 请求保护与权利要求 1 所述的水稻雄性育性控制基因 STS1 突变体相关的生物材料。

参见前述权利要求的评述，权利要求 1 所述基因 STS1 突变体不具备创造性。在此基础上，获得基因 STS1 突变体的编码蛋白，构建包含所述基因 STS1 突变体的表达盒、重组载体及其重组微生物均属于本领域的常规操作。因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 2 请求保护的技术方案对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 请求保护 SEQ ID NO.8 或者 SEQ ID NO.9 所示的 STS1 突变体的构建方法。

参见前述权利要求的评述，SEQ ID NO.8 或者 SEQ ID NO.9 所示的 STS1 突变体不具备创造性，基于相同的事实和理由，在对比文件 2 给出了所述基因 OsLDDT1 为水稻雄性育性调控基因，该基因突变导致水稻雄性不育的技术教导下，本领域技术人员容易想到采用常规的 CRISPR/Cas9 基因编辑手段突变其同源基因以

抑制其编码蛋白的表达，且具备能力依据靶基因编码框的序列信息设计基因编辑的前导序列，根据实际的实施条件和需要选择 CRISPR/Cas9 基因编辑载体和水稻受体品种，并通过常规技术手段加以实施和验证，以获得该同源基因的突变体。而借鉴现有技术已知的基因编辑和转化培养手段形成基因突变体的构建方法，属于本领域的常规操作。

因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 3 请求保护的技术方案对本领域技术人员而言是显而易见的，权利要求 3 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 所述的水稻雄性育性调控基因 STS1 突变体在水稻雄性育性调控中的应用，权利要求 5 对引用的权利要求 4 作了进一步限定。

参见前述权利要求的评述，权利要求 1 所述的水稻雄性育性调控基因 STS1 突变体不具备创造性。同时，对比文件 2 还公开了：本发明首次揭示了水稻基因 OsLDDT1 具有调控植物雄性育性的生物学功能。基于图位克隆和功能互补实验在水稻中验证了该基因的功能，用 pCAMBIA1300-OsLDDT1 功能互补载体转化突变体 lddt1 后，转基因植株雄配子育性恢复，即 OsLDDT1 基因功能丧失型突变导致雄性部分败育而功能互补该基因育性恢复正常。本发明水稻 OsLDDT1 基因功能丧失后完全败育；lddt1 突变体绒毡层降解和花粉囊壁的分化和退化进程均发生了延迟，最终导致其无成熟花粉和小穗完全不育；构建并测序验证成功的 pCAMBIA1300-OsLDDT1 的载体，转化到突变体 lddt1 后获得转基因植株，经潮霉素鉴定为阳性的植株正常种植于大田，于抽穗开花期取样观察发现，转基因植株的花药转变为乳黄色，花粉育性大于 80%。待灌浆至完全成熟，发现其小穗育性和结实率已基本与野生型相同这些表型进一步证明 ORF4 即为控制本研究中 lddt1 突变体花药发育畸形、无花粉的雄性不育基因。可见，对比文件 2 公开了所述基因 OsLDDT1 为水稻雄性育性调控基因，该基因突变导致水稻雄性不育，而功能互补该基因育性恢复正常。因而，在上述技术信息的教导下，本领域技术人员容易想到通过突变对比文件 2 所述的水稻雄性不育基因 OsLDDT1 的水稻同源基因获得水稻雄性不育材料，或将包含该同源基因的基因组序列通过基因工程技术导入到水稻雄性不育株系以获得雄性不育株系育性恢复的转基因水稻，并具备能力通过常规技术手段加以实施和验证。

因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 4-5 请求保护的技术方案对本领域技术人员而言是显而易见的，权利要求 4-5 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。

5. 权利要求 6-8 分别请求保护一种水稻雄性不育材料的应用。

参见前述权利要求的评述，权利要求 4 或 5 所述应用不具备创造性，在此基础上，由该应用获得相应的雄性不育材料对本领域技术人员而言是显而易见的，而进一步将获得的雄性不育材料分别与其他材料进行杂交和回交，以获得不能产生正常花粉的不同背景的稳定遗传雄性不育株系，或利用基因工程技术（包括利用“SPT”技术）将获得的雄性不育材料改造形成衍生不育系，或将上述不育系材料作为杂交水稻不育系母本应用于杂交水稻制种，均属于本领域的操作，本领域技术人员可根据实际需要进行选择。

因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 6-8 请求保护的技术方案对本领域技术人员而言是显而易见的，权利要求 6-8 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。

6. 权利要求 9 请求保护一种水稻雄性不育株系育性恢复的方法。

参见前述权利要求的评述，对比文件 2 公开了（参见摘要，实施例 6）：本发明首次揭示了水稻基因 OsLDDT1 具有调控植物雄性育性的生物学功能。基于图位克隆和功能互补实验在水稻中验证了该基因的功能，用 pCAMBIA1300-OsLDDT1 功能互补载体转化突变体 lddt1 后，转基因植株雄配子育性恢复，即 OsLDDT1 基因功能丧失型突变导致雄性部分败育而功能互补该基因育性恢复正常。pCAMBIA1300 载体构建：根据预测的候选基因序列设计引物，以 ZH8015 基因组 DNA 为模板，扩增了 LDDT1 全基因组 DNA 片段，该片段包括 2369bp 上游序列，全长编码区以及 862bp 下游序列。采用 In-Fusion(Takara)同源重组试剂盒将该片段连接到经 EcoR Ⅰ 和 Pst Ⅰ 线性化的载体 pCAMBIA1300 上。转化大肠杆菌，经菌液测序挑选 pLDDT1：：LDDT1-α 质粒阳性克隆。采用农杆菌介导的转化 lddt1 突变体幼穗诱导的愈伤组织。构建并测序验证成功的 pCAMBIA1300-OsLDDT1 的载体，转化到突变体 lddt1 后获得转基因植株，经潮霉素鉴定为阳性的植株正常

种植于大田，于抽穗开花期取样观察发现，转基因植株的花药转变为乳黄色，花粉育性大于 80%。待灌浆至完全成熟，发现其小穗育性和结实率已基本与野生型相同这些表型进一步证明 ORF4 即为控制本研究中 lddt1 突变体花药发育畸形、无花粉的雄性不育基因。可见，对比文件 2 公开了将包含所述水稻雄性育性调控基因 OsLDDT1 的基因组序列转化到突变体 lddt1 后，获得功能互补的雄性不育株系育性恢复转基因水稻。因而，在上述技术信息的教导下，本领域技术人员容易想到将包含从正常育性的常规水稻品种中获得的对比文件 2 所述基因的同源基因及其上游序列组成的基因组序列通过基因工程技术导入到水稻雄性不育株系，筛选获得雄性不育株系育性恢复的转基因水稻，并具备能力通过常规技术手段加以实施和验证。

因此，在对比文件 2 的基础上结合本领域的常规技术手段得到权利要求 9 请求保护的技术方案对本领域技术人员而言是显而易见的，权利要求 9 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. **针对申请人提交的意见陈述的回复：**

申请人在意见陈述书中强调了权利要求 1-9 具备创造性的理由如下：

本申请和对比文件 2 公开的基因都来自水稻，但属于完全不同的基因，SEQ ID NO:1 所示的基因序列和 SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列也并不相同。基因 OsLDDT1 可用于调控水稻雄性发育的技术启示并不能延伸至基因 STS1 及其突变体。由对比文件 2 无法显而易见地获得本申请权利要求 1 提出的 4 种水稻雄性育性控制基因 STS1 突变体。因此，本申请具备创造性。

针对上述意见陈述，审查员认为：

参见前述审查意见，结合对比文件 2 给出的所述基因 OsLDDT1 突变导致水稻雄性不育，而将包含基因 OsLDDT1 的基因组序列转化雄性不育突变体 lddt1 能够实现水稻雄性不育株系育性恢复的技术教导，本领域技术人员基于同一物种同源基因通常具有相同功能的普通技术知识，容易想到对比文件 2 所述基因 OsLDDT1 的水稻同源基因具有与之相同的功能，并具备能力通过常规技术手段从水稻品种日本晴中获得其同源基因，以及验证其是否具有上述相同的生物学功能，包括利用 CRISPR/Cas9 基因编辑手段突变该同源基因以抑制其编码蛋白的表达，获得同源基因突变体及其对应的水稻雄性不育材料等，这并不需要付出创造性的劳动，也不存在难以逾越的技术障碍，且其技术效果也并未超出本领域技术人员的合理预期。因此，本申请相比于对比文件 2 和常规技术手段的结合是显而易见的，不具有突出的实质性特点和显著的进步。

综上所述，申请人的意见陈述不具说服力。

基于上述理由，本申请的所有权利要求都不具备创造性，同时说明书中也没有记载其他任何可以授予专利权的实质性内容，因而即使申请人对权利要求进行重新组合和/或根据说明书记载的内容作进一步的限定，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表明本申请具备创造性的充分理由,本申请将被驳回或撤回。**申请人对申请文件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。**

审查员姓名:蒲恒　　　　审查员代码:30140972