

(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
2017年11月2日 (02.11.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/185244 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12R 1/93* (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/080299

(22) 国际申请日: 2016年4月27日 (27.04.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 广东省实验动物监测所 (GUANGDONG LABORATORY ANIMALS MONITORING INSTITUTE) [CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔区科学城风信路11号, Guangdong 510000 (CN)。广州市第八人民医院 (GUANGZHOU EIGHTH PEOPLE'S HOSPITAL) [CN/CN]; 中国广东省广州市东风东路627号, Guangdong 510000 (CN)。

(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, 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)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

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))。

(72) 发明人: 颜丙峰(YAN, Bingfeng); 中国广东省广州市黄埔区科学城风信路11号, Guangdong 510000 (CN)。郭鹏举(GUO, Pengju); 中国广东省广州市黄埔区科学城风信路11号, Guangdong 510000 (CN)。黄韧(HUANG, Ren); 中国广东省广州市黄埔区科学城风信路11号, Guangdong 510000 (CN)。张复春(ZHANG, Fuchun); 中国广东省广州市东风东路627号, Guangdong 510000 (CN)。赵令斋(ZHAO, Lingzhai); 中国广东省广州市东风东路627号, Guangdong 510000 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW FIRM); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西100号富力盈泰广场A栋910张萍, Guangdong 510627 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH,

(54) **Title:** RT-PCR-HRM OR PCR-HRM PRIMER, REAGENT, AND METHOD FOR RAPIDLY DISTINGUISHING FOUR TYPES OF SERUM DENGUE VIRUS

(54) **发明名称:** 一种快速区分四种血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物、试剂及方法

(57) **Abstract:** The present invention discloses an RT-PCR-HRM or PCR-HRM primer, reagent, and method for rapidly distinguishing four types of serum dengue virus.

(57) **摘要:** 本发明公开了一种快速区分四种血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物、试剂及方法。



WO 2017/185244 A1

发明名称:

一种快速区分四种血清型登革病毒的**RT-PCR-HRM**或**PCR-HRM**
引物、试剂及方法

- [1] 技术领域
- [2] 本发明涉及病毒基因分型的方法，具体涉及一种快速区分四种血清型登革病毒的**RT-PCR-HRM**或**PCR-HRM**引物和方法。
- [3] 背景技术
- [4] 登革病毒（dengue virus,DV)为有包膜的单股正链RNA病毒，属黄病毒科黄病毒属蚊媒病毒，其主要传播媒介为埃及伊蚊和白纹伊蚊，在我国主要为白纹伊蚊。它是引起人类登革热（dengue fever,DF）、登革出血热(dengue hemorrhagic fever,DHF)和登革休克综合征（dengue shock syndrome,DSS）的主要病原。1779年，在印度尼西亚雅加达，Bylon首先记述了这种被称为关节热的疾病，1869年由英国伦敦皇家内科学院将此病命名为登革热。登革热和登革出血热广泛流行于全球热带和亚热带地区的60多个国家和地区,特别是东南亚、太平洋岛屿及加勒比海地区,在欧洲和北美也发生过由输入性病例引起的小范围感染流行。20世纪,登革热在世界各地发生过多的大流行，病例数达百万，全球大约有25亿人口受到登革病毒感染的威胁，每年约有5000万到一亿人感染登革病毒，50万人需入院治疗，约24000人死亡。在我国流行广泛的地区有广东、广西、海南、辽宁等地,流行季节海南为4~6月，广东和广西为8月。早在1873年，我国厦门曾发生过登革热。1928~1929年，在广州、厦门、杭州、宁波、上海、台湾和香港等地流行。1940年，本病在上海至南通广大地区流行。1942~1945年，本病流行更加严重，不仅流行于沿海地区，甚至蔓延到内地如汉口等地。1978年5月广东佛山市石湾镇首先发生登革热，疫情迅速向四周蔓延。2002年夏天广州出现登革热流行，有1000多人发病。自2014年6月起，广东省发生了大范围的登革热爆发性流行，截止到11月中旬，广东全省登革热发病例已突破4万4千例，报告死亡病例6例。在台湾省高雄市，截止到2014年11月中旬，年度登革热发病例也突

破1万例，报告死亡病例15例。2015年截止到11月03日，台湾省共报告登革热病例数29921例，其中台南市达21874例，高雄市7521例，屏东县151例，其余县市均为移入地散发病情，目前累计死亡人数为129人，27例疑似死亡病例待审(台南9例、高雄17例、屏东县1例)，台湾仍有28人于加护病房治疗中。在中国大陆，截止到2015年10月17日，广东潮州市共报告登革热病例1273例。

- [5] 以上资料显示，近年来，登革热在我国亚热带及热带地区几乎每年都有爆发性大范围流行，在当地形成严重的社会公共卫生问题。
- [6] 登革病毒可分为四个抗原性密切相关的血清型，即登革1、2、3、4型。各型登革病毒之间核苷酸序列的同源性为63%-68%，同一血清型各病毒株之间核苷酸序列的同源性大于95%。4个血清型均可引起登革热、登革出血热和登革休克综合征。DV感染机体后可呈现两种不同的状态，即原发感染状态和继发感染状态。机体初次感染登革病毒后，可表现为隐性感染或一般的发热，症状不明显，同时对同型病毒产生免疫力，而且可能持续终生，但对异型病毒感染的保护作用持续时间较短。在第二次感染异型DV的患者中容易发生DHF和DSS，且病死率较高，其发病机制是依赖抗体增强的感染作用。区分这两种状态对于临床治疗非常重要。由于目前还没有成功的疫苗可以使用，也没有特效的治疗药物，因此登革病毒感染的早期诊断以及分型，对于病例的临床治疗以及疾病监测，流行病学调查和疾病控制措施的开展有非常重要的意义。
- [7] 在登革病毒感染实验室诊断方法上，血清学试验和分子生物学的研究已经取得一定的进展。登革病毒的鉴定及分型，传统的方法主要有病毒分离与鉴定、血凝抑制试验、补体结合试验、中和试验等。敏感细胞培养或动物分离病毒仍然是诊断的“金标准”，但这种方法很费时，且很多实验室缺少开展病毒分离所必备的条件。另一方面，病毒特异性抗体在发病3~5天后才能检测到，血清学早期检测灵敏度不高，且特异性差、操作繁琐、耗时，尤其是难以准确分型。随着各型登革病毒单克隆抗体的研制成功，基于登革病毒型特异性单克隆抗体的分型鉴定方法，如间接免疫荧光技术(IFA)、酶联免疫吸附技术(ELISA)广泛应用于全球各个登革病毒检测实验室，登革病毒的准确分型问题得到解决，但仍存在与其它黄病毒交叉反应问题，且耗时、成本高、操作复杂。1990年，Deubel等首次报道了应用PCR技

术检测登革病毒核酸。1992年, Lanciotti等设计一套巢式PCR引物, 利用各型登革病毒PCR扩增产物大小的不同来分型。此后的十多年时间内, 中外文献上出现了很多关于应用PCR技术检测登革病毒报道, 从多管两步法到单管一步法, 从四对型特异性引物分别反应到单管多重反应, 但仍存在需要多对引物、电泳检测环节易污染而导致假阳性等问题。荧光PCR虽然不易污染, 但需要多对引物探针, 价格昂贵, 从而不能广泛应用。

[8] 上述方法均未能克服操作复杂、费时、费用高、可靠性差等缺点, 在临床实践中的应用受限。因此, 目前急需一种操作相对简易、检测结果可靠且检测成本低廉的登革病毒血清型分型方法。

[9] 发明内容

[10] 为了解决上述存在的问题, 本发明建立了一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物和方法, 该方法操作简易、快速、检测结果可靠且检测成本低廉, 有利于在临床实践中推广应用。

[11] 本发明的目的在于提供三组快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物。

[12] 本发明的另一目的在于提供一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM方法。

[13] 本发明的再一目的在于提供一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM试剂。

[14] 本发明所采取的技术方案是:

[15] 碱基位点在快速区分不同血清型登革病毒中的应用, 所述碱基位点为:

[16] Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G, 第10671位碱基T, 第10672位碱基A, 第10675位碱基G;

[17] Genbank编号为AF038403.1的DV2标准株基因组中第10638位碱基A, 第10661位碱基C, 第10662位碱基T, 第10665位碱基G;

[18] Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G, 第10633位碱基C, 第10634位碱基T, 第10637位碱基G;

[19] Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A, 第10593

位碱基T，第10594位碱基G，第10597位碱基A。

- [20] 基因片段在快速区分不同血清型登革病毒中的应用，所述基因片段为：
- [21] 67bp的基因片段：
- [22] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTAC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 171) ；
- [23] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 172) ；
- [24] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 173) ；
- [25] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTAC
AACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 174) ；
- [26] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTGC
AACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 175) ；
- [27] 45bp的基因片段：
- [28] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 176) ；
- [29] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 177) ；
- [30] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 178) ；
- [31] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 179) ；
- [32] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 180) 。
- [33] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物，所述引物扩增出来的目的基因片段中含有以下碱基位点：
- [34] Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G，第10671位碱基T，第10672位碱基A，第10675位碱基G；

- [35] Genbank编号为AF038403.1的DV2标准株基因组中第10638位碱基A，第10661位碱基C，第10662位碱基T，第10665位碱基G；
- [36] Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G，第10633位碱基C，第10634位碱基T，第10637位碱基G；
- [37] Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A，第10593位碱基T，第10594位碱基G，第10597位碱基A。
- [38] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物，所述引物包括引物P1、P2和P3；
- [39] 引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~68中的至少一种；
- [40] 引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~96中的至少一种；
- [41] 引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 97~170中的至少一种。
- [42] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物，所述引物包括引物P1、P2和P3；
- [43] 引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~20中的至少一种；
- [44] 引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~80中的至少一种；
- [45] 引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 97~120中的至少一种。
- [46] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物，所述引物包括引物P1、P2和P3；
- [47] 引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~4中的至少一种；
- [48] 引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~71中的至少一种；
- [49] 引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 99~101中的至少一种。
- [50] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM试剂，该试剂含有上述所述的引物P1、P2和P3。
- [51] 一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM方法，包括以下步骤：
- [52] 1) 模板的制备：从样品中提取病毒RNA作为模板，或将该RNA反转录出cDNA作为模板，或构建含有HRM分型片段的质粒作为模板；
- [53] 2) 以提取的RNA为模板，用上述所述的引物对P1、P2进行RT-PCR反应；或者

以步骤1) 中所述的cDNA或质粒为模板, 用上述所述的引物对P1、P2进行PCR反应;

- [54] 3) 以阳性对照品为参照, 对扩增产物进行HRM分析;
- [55] 若样品的熔解温度与DV4阳性对照品一致, 则判定为DV4;
- [56] 若样品的熔解温度与DV2阳性对照品一致, 则判定为DV2;
- [57] 若样品的熔解温度与DV3阳性对照品一致, 则判定为DV3;
- [58] 若样品的熔解温度与DV1或DV4标准株的阳性对照品一致, 则判定为DV1或DV4标准株;
- [59] 4) DV1和DV4标准株的区分:
- [60] 重复步骤2) 的操作, 除了将其中的引用P1和P2替换为上述所述的引物对P1、P3, 其他操作不变; 以阳性对照品为参照, 对扩增产物进行HRM分析;
- [61] 若样品的熔解温度与DV1阳性对照品一致, 则判定为DV1;
- [62] 若样品的熔解温度与DV4标准株阳性对照品一致, 则判定为DV4标准株。

[63] 进一步的, 步骤2) 中所述RT-PCR的反应体系为:

- [64] RNA模板2μl
- [65] 10μmol引物P1..... 0.4μl
- [66] 10μmol引物P2或P30.4μl
- [67] TaKaRa Ex Taq HS0.4μl
- [68] PrimeScript RT enzyme Mix II0.4μl
- [69] 2X One Step RT-PCR Buffer III10μl
- [70] LC green 染料0.5μl
- [71] RNase Free ddH₂O 补至20μl。

[72] 进一步的, 步骤2) 中所述PCR的反应体系为:

- [73] Premix Taq™25μl
- [74] 质粒模板2μl
- [75] 10μmol上游引物P10.5μl
- [76] 10μmol下游引物P2/P30.5μl
- [77] LC green染料0.5μl

- [78] ddH₂O 补至50 μ l。
- [79] 进一步的，步骤2) 中所述RT-PCR的反应程序为：42°C 30min；94°C预变性2min；94°C变性30s、53°C退火30s、72°C延伸30s，循环35次；72°C终延伸8min。
- [80] 进一步的，所述PCR反应程序为：94°C预变性5min；94°C变性30s，53~55°C退火30s，72°C延伸30s；循环35次；72°C终延伸8min。
- [81] 本发明的有益效果是：
- [82] 1) 本发明首次建立了一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物和方法，利用本发明的引物和方法能简便的鉴别登革病毒四种血清型。
- [83] 2) 本发明操作简单：只需RT-PCR或PCR-HRM反应之前加荧光饱和染料即可；检测速度快且高通量：全部操作过程只需2~3小时，不需要病毒的细胞培养，极大缩短了分型所需时间；费用低，不需要特异性探针，每个样品的饱和染料成本为1 RMB；准确性高、特异性好，重复性好，可以准确、快速、高通量地进行分析，有利于在临床实践中推广应用。
- [84] 3) 本发明的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物通用性好，对4种血清型的登革病毒均有很好的扩增性，有助于提高PCR的效率，减少病毒鉴别分型的时间。
- [85] 4) 本发明的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物特异性好，除可以与4种血清型的登革病毒结合，不与其他常见黄病毒类病毒RNA结合，特异性扩增登革病毒RNA，有利于提高本发明对血清型分析的正确性。
- [86] 附图说明
- [87] 图1是四种血清型DV细胞培养液上清67bp RT-PCR产物电泳图；
- [88] 图2是四种血清型DV细胞培养液上清67bp RT-PCR产物标准化熔解曲线图；
- [89] 图3是四种血清型DV细胞培养液上清67bp RT-PCR产物峰型化熔解曲线图；
- [90] 图4是分别含DV1、DV2、DV3、DV4及DV4标准株中目的基因的质粒的67bp PCR产物的电泳图；
- [91] 图5是分别含DV1、DV2、DV3、DV4及DV4标准株中目的基因的质粒的67bp PCR产物标准化熔解曲线图；

- [92] 图6是分别含DV1、DV2、DV3、DV4及DV4标准株中目的基因的质粒的67bp PCR产物峰型化熔解曲线图；
- [93] 图7是分别含DV1、DV4标准株中目的基因的质粒的45bp PCR产物的电泳图；
- [94] 图8是分别含DV1、DV4标准株中目的基因的质粒的45bp PCR产物标准化熔解曲线图；
- [95] 图9是分别含DV1、DV4标准株中目的基因的质粒的45bp PCR产物峰型化熔解曲线图；
- [96] 图10是含DV1 中280bp目的基因的质粒测序结果中67bp的分型序列；
- [97] 图11是含DV2 中280bp目的基因的质粒测序结果中67bp的分型序列；
- [98] 图12是含DV3 中280bp目的基因的质粒测序结果中67bp的分型序列；
- [99] 图13是含DV4 中280bp目的基因的质粒测序结果中67bp的分型序列；
- [100] 图14是立菲生物合成的含DV4标准株中280bp质粒测序结果中67bp的分型序列。
- [101] 具体实施方式
- [102] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明，但并不局限于此。
- [103] 实施例1：快速区分不同血清型登革病毒的碱基位点和基因片段
- [104] (1) 本发明经过大量实验研究，发现以下碱基位点可用于快速区分不同血清型登革病毒：Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G，第10671位碱基T，第10672位碱基A，第10675位碱基G；
- [105] Genbank编号为AF038403.1 的DV2标准株基因组中第10638位碱基A，第10661位碱基C，第10662位碱基T，第10665位碱基G；
- [106] Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G，第10633位碱基C，第10634位碱基T，第10637位碱基G；
- [107] Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A，第10593位碱基T，第10594位碱基G，第10597位碱基A。
- [108] (2) 本发明经过进一步的实验研究，发现以下基因片段可用于快速区分不同血清型登革病毒：
- [109] 67bp的基因片段：

- [110] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTAC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 171) ;
- [111] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 172) ;
- [112] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC
AGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 173) ;
- [113] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTAC
AACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 174) ;
- [114] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTGC
AACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 175) ;
- [115] 45bp的基因片段:
- [116] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 176) ;
- [117] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 177) ;
- [118] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 178) ;
- [119] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 179) ;
- [120] 5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 180) 。
- [121] 实施例2 快速区分四种血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物
- [122] 本发明经过对所设计的大量引物进行实验筛选后, 发现可用于快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物, 所述引物扩增出来的目的片段中含有以下碱基位点:
- [123] Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G, 第10671位碱基T, 第10672位碱基A, 第10675位碱基G;
- [124] Genbank编号为AF038403.1 的DV2标准株基因组中第10638位碱基A, 第10661

位碱基C，第10662位碱基T，第10665位碱基G；

[125] Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G，第10633位碱基C，第10634位碱基T，第10637位碱基G；

[126] Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A，第10593位碱基T，第10594位碱基G，第10597位碱基A。

[127] 进一步通过实验筛选，发现引物P1、P2、P3的联合使用对RT-PCR-HRM方法区分四种血清型登革病毒的效果最好。

[128] 其中，引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~68中的至少一种。

[129] 引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~96中的至少一种。

[130] 引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 97~170中的至少一种。

[131] 实施例3：一种快速区分四种血清型登革病毒的RT-PCR-HRM的方法

[132] 1) DV中RNA的提取：

[133] 临床分离的登革病毒细胞培养液上清由广州市第八人民医院提供。用天根病毒DNA/RNA提取试剂盒（OSR-M202），在TGuide M16自动核酸提取仪上分别提取临床上分离得到的四种血清型登革病毒细胞培养液上清中的登革病毒RNA，作为后续一步法RT-PCR的模板。

[134] 2) 一步法RT-PCR：

[135] 利用Takara One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time)试剂盒，内含TaKaRa Ex Taq HS，PrimeScript RT enzyme Mix II，2X One Step RT-PCR Buffer III等。20μl的体系：RNA模板根据实际浓度加入5μl之内的量，一般为2μl。TaKaRa Ex Taq HS加0.4μl，上下游引物各加0.4μl，PrimeScript RT enzyme Mix II加0.4μl，2X One Step RT-PCR Buffer III 10μl,LC green 染料加入0.5μl。用RNase Free ddH₂O补至20μl。

[136] 本实施例中具体的反应体系为：

[137] RNA模板2μl

[138] 10μmol引物P10.4μl

[139] 10μmol引物P20.4μl

[140] TaKaRa Ex Taq HS0.4μl

- [141] PrimeScript RT enzyme Mix II0.4 μ l
- [142] 2X One Step RT-PCR Buffer III10 μ l
- [143] LC green 染料0.5 μ l
- [144] RNase Free ddH₂O补至20 μ l。
- [145] 上述引物P1的序列为5'-AAACAGCATATTGACGCTGG-3'(SEQ ID NO:3);
- [146] 引物P2的序列为5'-CTGTGCCTGGAATGATG-3'(SEQ ID NO:69)。
- [147] RT-PCR反应程序是: 42°C
30min; 94°C预变性2min; 94°C变性30s、53°C退火30s、72°C延伸30s, 循环35次
; 72°C终延伸8min, 扩增产物在Rotor-Gene Q仪器上进行分析。
- [148] 3) 结果分析:
- [149] 电泳检测: 上述RT-PCR产物的电泳图见图1, 从图1中可以看出, 本实施例中临床上得到的四种血清型登革病毒都能被扩增出67bp的基因片段, 并进行测序(由上海生工生物工程有限公司完成), 测序结果显示, DV1(登革病毒1型)、DV2(登革病毒2型)、DV3(登革病毒3型)的67bp片段均与相应的标准株一致, 而本实施例选用的DV4(登革病毒4型)的67bp片段与DV4标准株存在一个碱基突变(67bp片段的第47位碱基G突变成了A), 即SEQ ID NO: 174与SEQ ID NO: 175中第47位碱基存在碱基突变。
- [150] HRM分析:
- [151] 对上述RT-PCR产物均在Rotor-Gene Q仪器上进行HRM(高分辨率熔解曲线分析技术)分析, 分析结果见图2和图3。
- [152] 图2是四种血清型DV细胞培养液上清67bp RT-PCR产物标准化熔解曲线图; 从中可以看出DV1、DV2、DV3和DV4熔解曲线相互分开, 表明所设计引物P1和P2适合用于该4种血清型DV的HRM分析, 能够区分四种血清型的登革病毒。
- [153] 图3是四种血清型DV细胞培养液上清67bp RT-PCR产物峰型化熔解曲线图; 从中可以看出DV1、DV2、DV3和DV4的熔解温度(T_m)均不同, DV4的熔解温度最低为76.9°C, DV1、DV2、DV3的熔解温度依次为77.6°C、77.9°C和78.16°C。
- [154] 实施例4: 一种快速区分四种血清型登革病毒的PCR-HRM的方法

[155] 为了进一步分析引物P1、P2是否能够区分DV1、DV2、DV3、DV4、DV4标准株，本实施例构建了包含67bp及45bp分型片段的280bp质粒，并另外增加了一份人工合成基因片段的质粒样品（DV4标准株280bp片段，包含67bp及45bp分型片段，克隆于puc57质粒中，由上海立菲生物技术有限公司合成）。

[156] 1) 含DV 280bp目的基因的质粒样品的制备：

[157] 以上游引物5'-GCWGCCTGTAGCTCC-3'（SEQ ID NO: 181），下游引物5'-CTGTGCCTGGAATGATG-3'（SEQ ID NO: 182）扩增登革病毒基因的280bp片段（包含67bp及45bp HRM分型片段），纯化回收PCR产物，与Takara pMD-18T vector连接。

[158] 载体连接反应体系（10 μ l）：

[159] [Table 1]

Ligation Solution I	5 μ l
纯化的登革病毒280bp DNA产物	4.5 μ l
pMD-18T vector	0.5 μ l
总体积	10 μ l

[160] 反应条件：16 $^{\circ}$ C，4h以上。

[161] 取-70 $^{\circ}$ C冻存的感受态细胞于冰上融化后，加入连接产物5 μ l，轻轻混匀，冰浴30min。42 $^{\circ}$ C水浴热激90sec，再迅速放回冰上2min。加入400 μ l LB液体培养基，37 $^{\circ}$ C200r/min-220r/min振荡培养45min后，以恢复质粒的抗性。4 $^{\circ}$ C4000r/min离心5min，弃去上清400 μ l，将剩余的100 μ l菌液混匀后涂氨苄平板，37 $^{\circ}$ C培养30min（平皿正放），待菌液吸收完全，再将平皿倒置培养约12h~16h，至单菌落出现。用灭菌牙签挑取单菌落于5ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中，37 $^{\circ}$ C200r/min-220r/min振荡培养12h~16h，经菌液PCR鉴定为阳性。

[162] 2) 质粒的抽提：

[163] 用TIANprep Mini Plasmid Kit质粒小提试剂盒分别提取DV1、DV2、DV3、DV4、DV4标准株的质粒。

[164] 3) PCR扩增：

- [165] DV1、DV2、DV3、DV4、DV4标准株质粒的PCR扩增体系为：
- [166] Premix Taq™(TaKaRa Taq™ Version 2.0)25μl
- [167] 质粒模板2μl
- [168] 10μmol上游引物P10.5μl
- [169] 10μmol下游引物P20.5μl
- [170] LC green染料0.5μl
- [171] ddH₂O 补至50μl。
- [172] 上述引物P1的序列为5'-AAACAGCATATTGACGCTGG-3'(SEQ ID NO:3)；
- [173] 引物P2的序列为5'-CTGTGCCTGGAATGATG-3'(SEQ ID NO:69)。
- [174] PCR反应程序：
- [175] 94°C预变性5min；94°C变性30s，53°C退火30s(下游引物为P2时；下游引物为P3时退火温度为55°C)，72°C延伸30s；循环35次；72°C终延伸8min。
- [176] 4) 结果分析：
- [177] 电泳检测：上述PCR扩增产物的电泳图见图4，从图4中可以看出，本实施例中所有样品都能被扩增出67bp的基因片段。对构建的280bp质粒进行测序（由上海生工生物工程有限公司完成），测序结果均正确。
- [178] HRM分析：对上述PCR产物均在Rotor-Gene Q仪器上进行HRM（高分辨熔解曲线分析技术）分析，分析结果见图5和图6。
- [179] 图5是四种血清型DV质粒及人工合成的DV4标准株质粒的67bp PCR产物标准化熔解曲线图；从中可以看出，DV2、DV3、DV4的标准化熔解曲线可以很好地区分开，但DV1和DV4标准株的曲线混合在一起，不能被有效区分。
- [180] 图6是四种血清型DV质粒及人工合成的DV4标准株质粒的67bp PCR产物峰型化熔解曲线图；同图5，DV2、DV3、DV4的峰型化熔解曲线可以很好地区分开，DV4的熔解温度为79.29±0.028°C，DV2的熔解温度为80.52±0.027°C，DV3的熔解温度为80.93±0.025°C，DV1或DV4标准株的熔解温度为80.26±0.038°C，但DV1和DV4标准株的曲线混合在一起，不能被有效区分。
- [181] 5) DV1和DV4标准株的区分：
- [182] 将DV1和DV4标准株的质粒分别进行PCR扩增，除了所用的引物为P1和P3，其

他操作均同上述步骤2)；

- [183] 上述引物P1的序列为5'-AAACAGCATATTGACGCTGG-3'(SEQ ID NO:3)；
- [184] 引物P3的序列为5'-GAGACAGCAGGATCTCTG-3'(SEQ ID NO:101)；
- [185] 电泳检测：上述PCR扩增产物的电泳图见图7，从图7中可以看出，DV1和DV4标准株样品都能被扩增出45bp的基因片段。并对扩增出来的基因片段分别进行测序（由上海生工生物工程有限公司完成），测序结果均正确。
- [186] HRM分析：对上述PCR产物均在Rotor-Gene Q仪器上进行HRM（高分辨熔解曲线分析技术）分析，分析结果见图8和图9。
- [187] 图8是DV1、DV4标准株质粒的45bp PCR产物标准化熔解曲线图；从中可以看出DV1和DV4标准株熔解曲线相互分开，表明所设计引物P1和P3适合用于该2种血清型DV（DV1和DV4）的HRM分析。
- [188] 图9是DV1、DV4标准株质粒的45bp PCR产物峰型化熔解曲线图；从中可以看出DV1和DV4标准株的熔解温度（ T_m ）不同，DV4标准株的熔解温度为 $76.13 \pm 0.023^\circ\text{C}$ ，DV1的熔解温度为 $76.77 \pm 0.031^\circ\text{C}$ ，可被很好地区分开。
- [189] 图10是DV1中280bp碱基片段测序结果中相应67bp碱基的分型序列测序图；
- [190] 图11是DV2中280bp碱基片段测序结果中相应67bp碱基的分型序列测序图（测序图为反向互补序列）；
- [191] 图12是DV3中280bp碱基片段测序结果中相应67bp碱基的分型序列测序图；
- [192] 图13是DV4中280bp碱基片段测序结果中相应67bp碱基的分型序列测序图；
- [193] 图14是立菲生物合成的DV4标准株的280bp碱基片段中相应67bp碱基的分型序列测序图。
- [194] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

- [权利要求 1] 碱基位点在快速区分不同血清型登革病毒中的应用，所述碱基位点为：
Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G，第10671位碱基T，第10672位碱基A，第10675位碱基G；
Genbank编号为AF038403.1的DV2标准株基因组中第10638位碱基A，第10661位碱基C，第10662位碱基T，第10665位碱基G；
Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G，第10633位碱基C，第10634位碱基T，第10637位碱基G；
Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A，第10593位碱基T，第10594位碱基G，第10597位碱基A。
- [权利要求 2] 基因片段在快速区分不同血清型登革病毒中的应用，所述基因片段为：
67bp的基因片段：
5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 171)；
5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 172)；
5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 173)；
5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 174)；
5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTGCAACATCAATCCAGGCACAG-3' (SEQ ID NO: 175)

) ;

45bp的基因片段:

5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCT
GTCTC-3' (SEQ ID NO: 176) ;

5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCT
GTCTC-3' (SEQ ID NO: 177) ;

5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCT
GTCTC-3' (SEQ ID NO: 178) ;

5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCT
GTCTC-3' (SEQ ID NO: 179) ;

5'-AAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCT
GTCTC-3' (SEQ ID NO: 180) 。

[权利要求 3]

一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物, 所述引物扩增出来的目的基因片段中含有以下碱基位点:

Genbank编号为EU848545.1的DV1标准株基因组中第10648位碱基G, 第10671位碱基T, 第10672位碱基A, 第10675位碱基G;

Genbank编号为AF038403.1的DV2标准株基因组中第10638位碱基A, 第10661位碱基C, 第10662位碱基T, 第10665位碱基G;

Genbank编号为M93130.1的DV3标准株基因组中第10610位碱基G, 第10633位碱基C, 第10634位碱基T, 第10637位碱基G;

Genbank编号为AY947539.1的DV4标准株基因组中第10570位碱基A, 第10593位碱基T, 第10594位碱基G, 第10597位碱基A。

[权利要求 4]

根据权利要求3所述的一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物, 所述引物包括引物P1、P2和P3;

引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~68中的至少一种;

引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~96中的至少一种;

引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 97~170中的至少一种。

[权利要求 5]

根据权利要求4所述的一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-

R-HRM或PCR-HRM引物，所述引物包括引物P1、P2和P3；
引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~20中的至少一种；
引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~80中的至少一种；
引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 97~120中的至少一种。

[权利要求 6]

根据权利要求5所述的一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM引物，所述引物包括引物P1、P2和P3；
引物P1的碱基序列选自SEQ ID NO: 1~4中的至少一种；
引物P2的碱基序列选自SEQ ID NO: 69~71中的至少一种；
引物P3的碱基序列选自SEQ ID NO: 99~101中的至少一种。

[权利要求 7]

一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM试剂，其特征在于：该试剂含有权利要求3~6任一所述的引物P1、P2和P3。

[权利要求 8]

一种快速区分不同血清型登革病毒的RT-PCR-HRM或PCR-HRM方法，其特征在于：包括以下步骤：

- 1) 模板的制备：从样品中提取病毒RNA作为模板，或将该RNA反转录出cDNA作为模板，或构建含有HRM分型片段的质粒作为模板；
- 2) 以提取的RNA为模板，用权利要求3~6任一所述的引物对P1、P2进行RT-PCR反应；或者以步骤1)中所述的cDNA或质粒为模板，用权利要求3~6任一所述的引物对P1、P2进行PCR反应；
- 3) 以阳性对照品为参照，对扩增产物进行HRM分析；
若样品的熔解温度与DV4阳性对照品一致，则判定为DV4；
若样品的熔解温度与DV2阳性对照品一致，则判定为DV2；
若样品的熔解温度与DV3阳性对照品一致，则判定为DV3；
若样品的熔解温度与DV1或DV4标准株的阳性对照品一致，则判定为DV1或DV4标准株；
- 4) DV1和DV4标准株的区分：
重复步骤2)的操作，除了将其中的引物P1和P2替换为权利要求3

~6任一所述的引物对P1、P3，其他操作不变；以阳性对照品为参照，对扩增产物进行HRM分析；

若样品的熔解温度与DV1阳性对照品一致，则判定为DV1；

若样品的熔解温度与DV4标准株阳性对照品一致，则判定为DV4标准株。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述的方法，其特征在于：步骤2)中所述RT-PCR的反应体系为：

- RNA模板2μl
- 10μmol引物P10.4μl
- 10μmol引物P2或P30.4μl
- TaKaRa Ex Taq HS0.4μl
- PrimeScript RT enzyme Mix II0.4μl
- 2X One Step RT-PCR Buffer III10μl
- LC green 染料0.5μl
- RNase Free ddH₂O补足20μl。

[权利要求 10] 根据权利要求8所述的方法，其特征在于：步骤2)中所述PCR的反应体系为：

- Premix Taq™25μl
- 质粒模板2μl
- 10μmol上游引物P10.5μl
- 10μmol下游引物P2/P30.5μl
- LC green染料0.5μl
- ddH₂O补足50μl。

[权利要求 11] 根据权利要求8或9所述的方法，其特征在于：步骤2)中所述RT-PCR的反应程序为：42°C30min；94°C预变性2min；94°C变性30s、53°C退火30s、72°C延伸30s，循环35次；72°C终延伸8min。

[权利要求 12] 根据权利要求9或10所述的方法，其特征在于：所述PCR反应程序为：94°C预变性5min；94°C变性30s，53~55°C退火30s，72°C延伸

30s; 循环35次; 72°C终延伸8min。

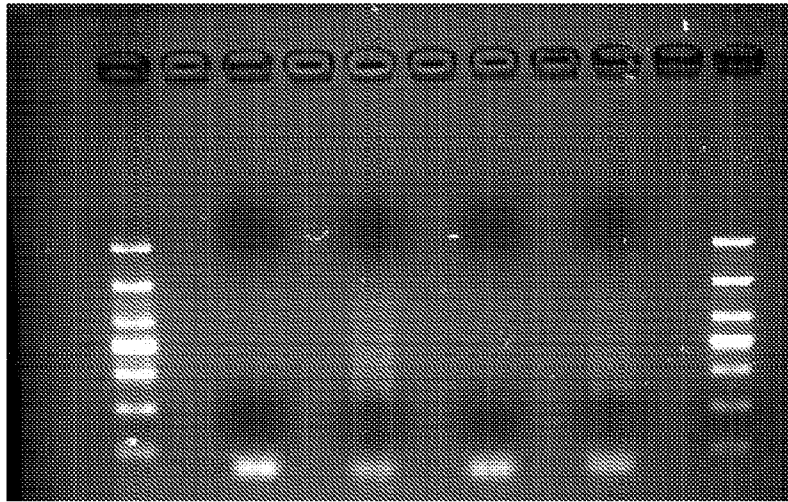


图 1

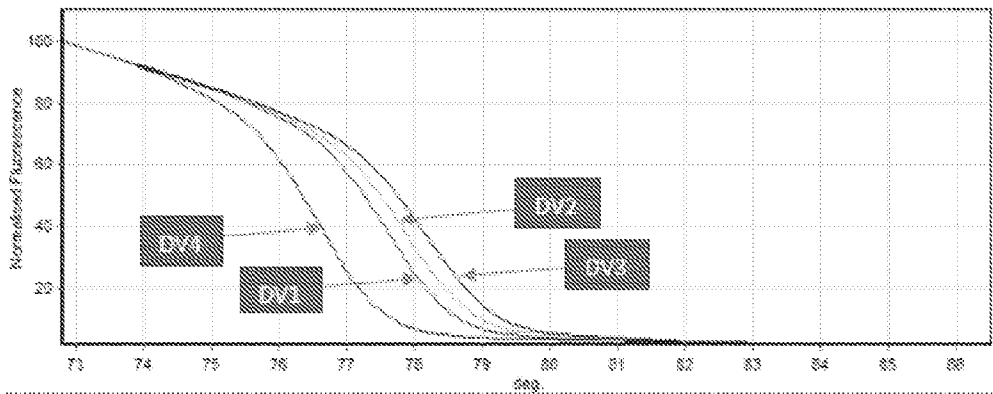


图 2

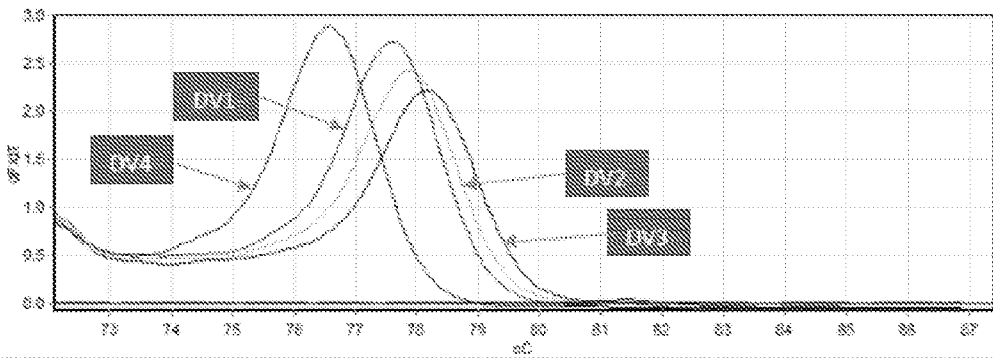


图 3

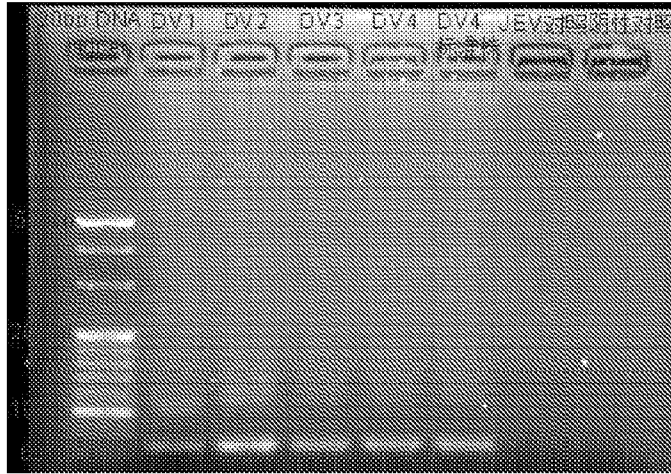


图 4

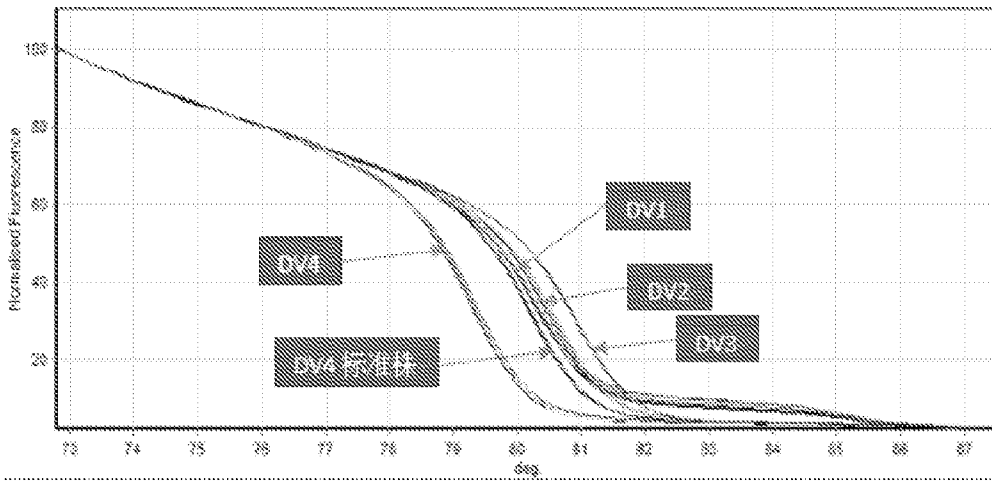


图 5

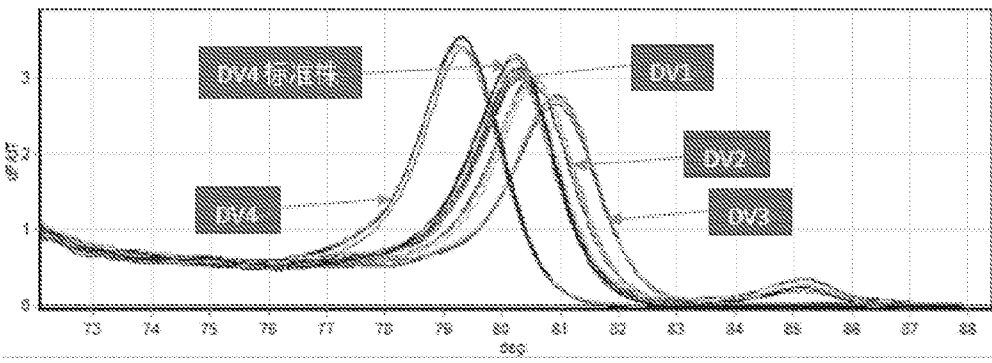


图 6

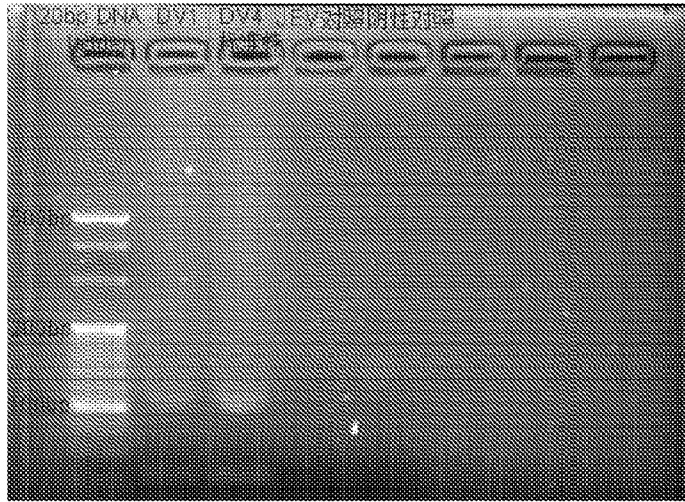


图 7

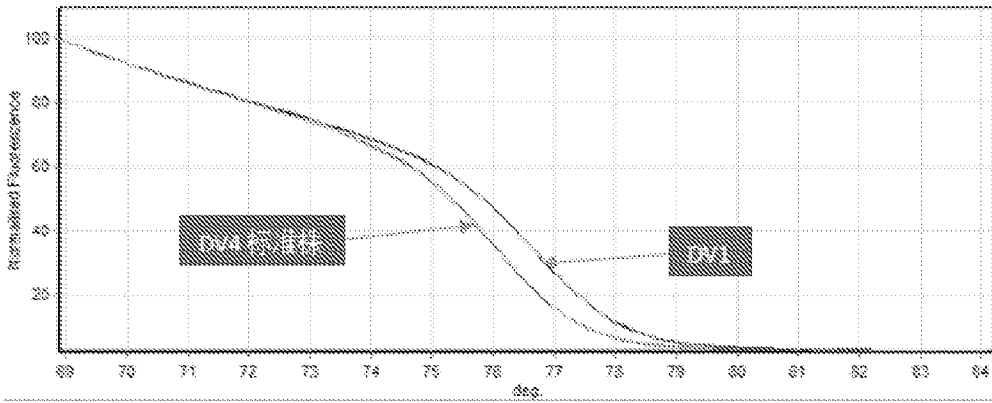


图 8

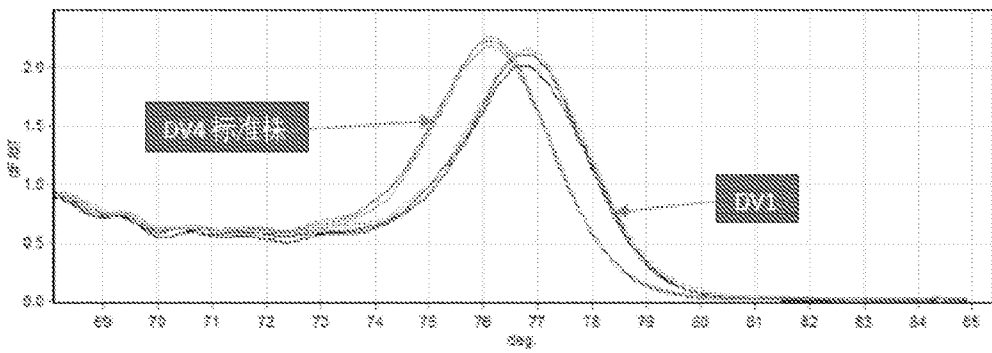


图 9

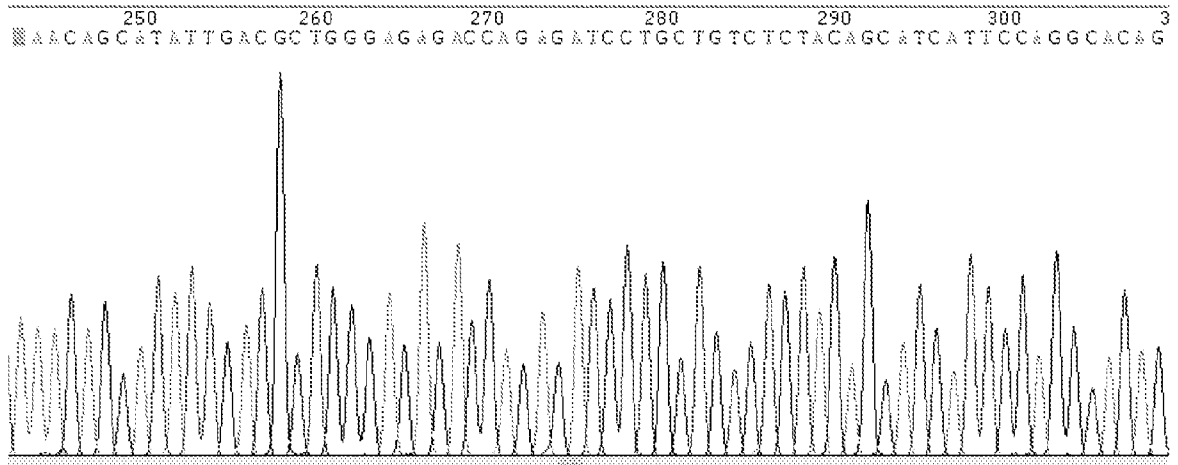


图 10

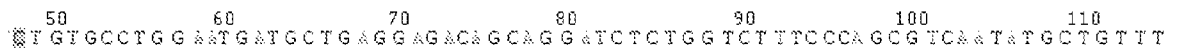


图 11

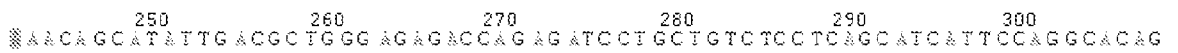


图 12

260 270 280 290 300 310 320
AACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAAACATCAATTCCAGGCACAG

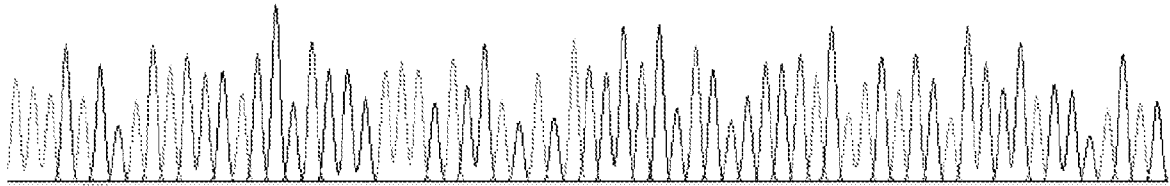


图 13

250 260 270 280 290 300 310
AACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTGCAACATCAATTCCAGGCACAG

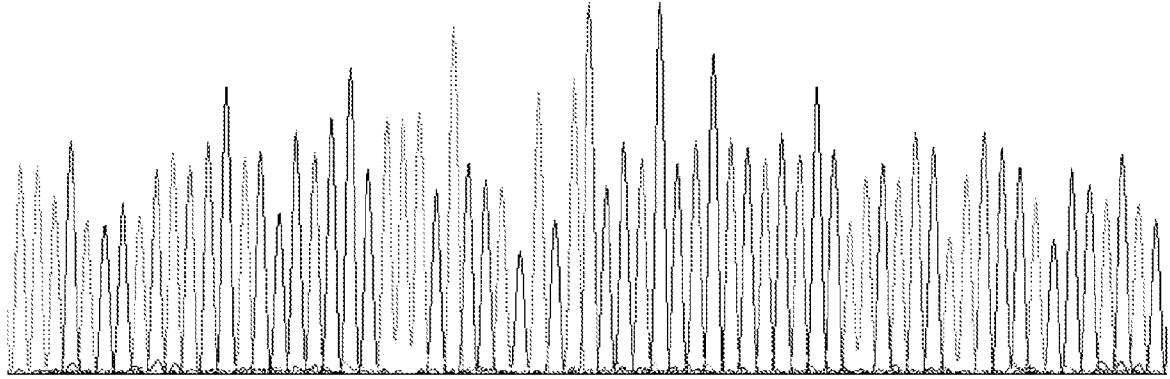


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/080299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68 (2006.01) i; C12Q 1/70 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i; C12R 1/93 (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)		
C12Q; C12N; C12R		
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; CNTXT; CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CJFD; CNKI; ISI Web of Knowledge, PUBMED; CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCHING SYSTEM; PCR, serotype, dengue virus, detection, sequence query based on SEQ ID Nos: 171-180		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104711373 A (ZHANG, Jin) 17 June 2015 (17.06.2015) SEQ1DNo:7	3-12
A	CN 104328222 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 04 February 2015 (04.02.2015) the whole document	1-12
A	WO 2014055746 A1 (UNIVERSITY LELAND STANFORD JUNIOR) 10 April 2014 (10.04.2014) the whole document	1-10
A	CN 103173568 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 26 June 2013 (26.06.2013) the whole document	1-10
<input 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 "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	
21 October 2016	09 January 2017	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanxia Telephone No. (86-10) 62089438	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/080299

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104711373 A	17 June 2015	None	
CN 104328222 A	04 February 2015	WO 2016078553 A1	26 May 2016
		CN 104328222 B	25 November 2015
WO 2014055746 A1	10 April 2014	HK 1213603 A1	08 July 2016
		SG 11201502618PA	28 May 2015
		MX 2015004191 A	04 April 2016
		US 2015225802 A1	13 August 2015
		EP 2904120 A1	12 August 2015
		IN 2893DEN2015 A	11 September 2015
CN 103173568 A	26 June 2013	CN 103173568 B	10 December 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/080299

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2006.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12R 1/93(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>C12Q, C12N, C12R</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, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED:血清型, 登革病毒, 鉴定, 检测, PCR, serotype, dengue virus, detection 中国专利生物序列检索系统: 基于SEQ ID Nos: 171-180的序列检索</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>X</td> <td>CN 104711373 A (张瑾) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17) SEQ ID No:7</td> <td>3-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104328222 A (扬州大学) 2015年 2月 4日 (2015 - 02 - 04) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014055746 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2014年 4月 10日 (2014 - 04 - 10) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103173568 A (中山大学) 2013年 6月 26日 (2013 - 06 - 26) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input 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> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 104711373 A (张瑾) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17) SEQ ID No:7	3-12	A	CN 104328222 A (扬州大学) 2015年 2月 4日 (2015 - 02 - 04) 全文	1-12	A	WO 2014055746 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2014年 4月 10日 (2014 - 04 - 10) 全文	1-10	A	CN 103173568 A (中山大学) 2013年 6月 26日 (2013 - 06 - 26) 全文	1-10	* 引用文件的具体类型:	“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	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“&” 同族专利的文件	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“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	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																											
X	CN 104711373 A (张瑾) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17) SEQ ID No:7	3-12																											
A	CN 104328222 A (扬州大学) 2015年 2月 4日 (2015 - 02 - 04) 全文	1-12																											
A	WO 2014055746 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2014年 4月 10日 (2014 - 04 - 10) 全文	1-10																											
A	CN 103173568 A (中山大学) 2013年 6月 26日 (2013 - 06 - 26) 全文	1-10																											
* 引用文件的具体类型:	“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																												
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																												
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																												
“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)	“&” 同族专利的文件																												
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件																													
“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																													
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																												
2016年 10月 21日	2017年 1月 9日																												
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																												
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	张艳霞																												
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62089438																												

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/080299

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	104711373	A	2015年 6月 17日	无	
CN	104328222	A	2015年 2月 4日	WO	2016078553 A1 2016年 5月 26日
				CN	104328222 B 2015年 11月 25日
WO	2014055746	A1	2014年 4月 10日	HK	1213603 A1 2016年 7月 8日
				SG	11201502618P A 2015年 5月 28日
				MX	2015004191 A 2016年 4月 4日
				US	2015225802 A1 2015年 8月 13日
				EP	2904120 A1 2015年 8月 12日
				IN	2893DEN2015 A 2015年 9月 11日
CN	103173568	A	2013年 6月 26日	CN	103173568 B 2014年 12月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)