

(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
2018 年 7 月 19 日 (19.07.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/129644 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/070711

(22) 国际申请日: 2017 年 1 月 10 日 (10.01.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大智造科技有限公司 (MGI TECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 李计广 (LI, Jiguang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 马可心 (MA, Kexin); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 邱敏 (QIU, Min); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 陈奥 (CHEN, Ao); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 徐崇钧 (XU, Chongjun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 章文

蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 (DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳福田区金田路与福华路交汇处现代商务大厦 2201, Guangdong 518048 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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,

(54) Title: METHOD, REACTION SYSTEM AND KIT FOR IMPROVING QUALITY OF NUCLEIC ACID POLYMERIZATION SEQUENCING

(54) 发明名称: 一种提高核酸聚合测序质量的方法、反应体系和试剂盒

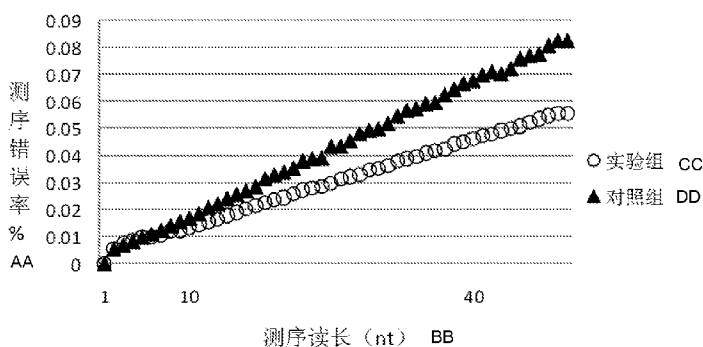


图 5

AA SEQUENCING ERROR RATE
BB SEQUENCING READ LENGTH
CC EXPERIMENTAL GROUP
DD CONTROL GROUP

(57) Abstract: Disclosed are a method, a reaction system and a kit for improving the quality of nucleic acid polymerization sequencing. The method for improving the quality of nucleic acid polymerization sequencing of the present application comprises: adding a second nucleotide into a polymerization sequencing reaction solution, a 3' saccharide hydroxyl group of the second nucleotide being provided with a blocking modification but no fluorescence modification.

(57) 摘要: 公开了一种提高核酸聚合测序质量的方法、反应体系和试剂盒。本申请的提高核酸聚合测序质量的方法, 包括在聚合测序的反应液中加入第二类核苷酸, 第二类核苷酸的 3' 糖羟基具有阻断修饰但没有荧光修饰。

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)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种提高核酸聚合测序质量的方法、反应体系和试剂盒

技术领域

本申请涉及核酸测序领域，特别是涉及一种提高核酸聚合测序质量的方法、反应体系和试剂盒。

背景技术

核酸聚合测序即边合成边测序(缩写 SBS),是指在 SBS 过程中(Metzker et. al., Genome Res 15(12): 1767-1776 (2005)),加入经过荧光标记的核苷酸能够帮助识别模板 DNA 碱基(Prober et. al., Science 238:336-341(1987)),从而给出 DNA 序列信息。近年来,与其它测序方法相比,聚合测序以其通量高、价格低而获得青睐。在这一测序方法中,通过 DNA 聚合酶合成可逆终止和带有荧光信号的碱基;具体的,使用在 3' 糖羟基具有修饰的核苷酸,从而阻断其它核苷酸的加入,通过荧光信号来区分 4 种不同的碱基。在去除阻断和荧光基团后,恢复天然游离的 3' 羟基基团用于加入下一个核苷酸,并且去除荧光信号,以便于下一个碱基的合成和检测。在 SBS 中,对于合成效率要求很高,在多个拷贝中一旦出现合成不完全的情况,就会导致信号的混乱,影响测序的读长和准确性。而在边合成边测序中要求加入的带有可逆阻断和荧光基团的核苷酸,由于修饰的增加导致该核苷酸的分子较大,分子结构比较特殊,与没有修饰的核苷酸相比,DNA 聚合酶识别和合成这种带修饰的 dNTPs 的效率较低,限制了聚合测序的读长和准确度。

发明内容

本申请的目的是提供一种改进的新的提高核酸聚合测序质量的方法、反应体系和试剂盒。

为了实现上述目的,本申请采用了以下技术方案:

本申请公开了一种提高核酸聚合测序质量的方法,包括在聚合测序的反应液中加入第二类核苷酸,第二类核苷酸的 3'糖羟基具有阻断修饰但没有荧光修饰。

需要说明的是,本申请的关键在于,在聚合测序的反应液中加入了仅仅具有阻断修饰的 dNTPs,即第二类核苷酸。阻断修饰的 dNTPs 对于 DNA 聚合酶识别和合成的影响相对较小,因此,第二类核苷酸的加入,能够补充反应不完全的部分,提高合成反应的效率,降低反应不充分的风险;并且,由于第二类

核苷酸没有荧光修饰，降低了因为荧光切除不干净，或者切除的荧光洗脱不干净导致的信号干扰，提高了切除的效率，降低了测序错误率；从而起到提高测序质量的作用。可以理解，本申请的方法，其关键在于，在聚合测序的反应液中加入仅仅具有阻断修饰的第二类核苷酸，至于反应液其它组分，以及具体的反应条件，可以参考现有的聚合测序方法。

优选的，第二类核苷酸的用量，与反应液中第一类核苷酸的用量相同，第一类核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸。

需要说明的是，本申请中第一类核苷酸就是聚合测序中正常添加的核苷酸，本申请优选的方案中，第二类核苷酸和第一类核苷酸是等量加入的。可以理解，在一些特殊的设计方案中，第二类核苷酸的用量可以根据需求进行调整，但是，只要加入了第二类核苷酸都可以在一定程度上起到提高合成反应效率、降低测序错误率的效果。

本申请的另一面公开了本申请的方法在核酸测序中的应用。本申请的方法适用于人类基因组和其它动物、植物和微生物物种的核酸序列测序；主要应用包括 WES、WGS、RNA、DNA 等测序；本申请的一个实施例中，将本申请的方法用于大肠杆菌的 DNA 测序。

本申请的再一面公开了一种核酸测序方法，包括在边合成边测序的过程中，于其反应液中同时添加两类核苷酸，第一核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸，第二类核苷酸为 3'糖羟基仅具有阻断修饰但没有荧光修饰的核苷酸。

可以理解，本申请的提高核酸聚合测序质量的方法，可以应用于各种基于边合成边测序的测序平台，在不改变其测序条件和参数的情况下，只需要在其反应液中添加本申请的第二类核苷酸即可。

本申请的另一面公开了一种提高核酸测序质量的反应体系，包括用于边合成边测序的反应液，该反应液中添加有第二类核苷酸，第二类核苷酸的 3'糖羟基具有阻断修饰但没有荧光修饰。

优选的，反应液包括反应缓冲液、DNA 聚合酶和第一类核苷酸，第一类核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸。

本申请的再一面公开了一种含有本申请的反应体系的核酸测序试剂盒。

可以理解，本申请的关键发明思路在于，在边合成边测序的反应液中添加仅仅具有阻断修饰的 dNTPs，即第二类核苷酸，以提高合成效率；基于该发明思路，为了使用方便，本申请进一步提出了一种提高核酸测序质量的反应体系，即添加有第二类核苷酸的边合成边测序的反应液。采用本申请的反应试剂体系，

可以有效的提高测序质量。同样的，为了方便，也完全可以将本申请的反应试剂体系制成核酸测序试剂盒。

由于采用以上技术方案，本申请的有益效果在于：

本申请的提高核酸聚合测序质量的方法，在其反应液中添加仅仅具有阻断修饰的 dNTPs，由于这类 dNTPs 没有荧光修饰，更利于 DNA 聚合酶识别和合成，能够补充反应不完全的部分，提高合成反应的效率，降低反应不充分的风险；与此同时，由于没有荧光修饰，降低了因荧光切除不干净，或者切除的荧光洗脱不干净导致的信号干扰，提高了切除效率，降低了测序错误率。

附图说明

图 1 是本申请实施例中第二类核苷酸的结构示意图；

图 2 是本申请实施例中第一类核苷酸的结构示意图；

图 3 是本申请实施例中每个循环的荧光信号变化曲线；

图 4 是本申请实施例中每个循环的测序质量变化曲线；

图 5 是本申请实施例中每个循环的测序错误率变化曲线。

具体实施方式

边合成边测序的关键就在于，在反应液中添加同时具有阻断修饰和荧光修饰的 dNTPs，但是，本申请的发明人经过大量的试验和研究发现，阻断修饰和荧光修饰的 dNTPs 会影响 DNA 聚合酶的识别和合成效率，从而限制聚合测序的读长和准确度。经过深入研究发现，其中荧光修饰是影响 DNA 聚合酶的识别和合成效率的主要原因；因此，本申请提出，在现有的聚合测序反应液的基础上，添加仅仅具有阻断修饰的 dNTPs；这样，一方面，可以通过第二类核苷酸补充反应不完全的部分，保障合成效率，降低反应不充分的风险；另一方面，由于第二类核苷酸没有荧光修饰，也减低了荧光切除不干净，或者切除的荧光洗脱不干净导致的信号干扰，提高了切除的效率，降低了测序错误率。

下面通过具体实施例和附图对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明，不应理解为对本申请的限制。

实施例

本例的核酸测序方法在 BGISEQ-500 测序平台上进行，测序样品为大肠杆菌标准文库。具体方案如下：

(1) 使用 BGISEQ-500 的测序平台，并按照说明书使用与该平台配套的测序试剂；

(2) 按照表 1 配方配制 dNTP 1 混合液，即第一类核苷酸；本例的第一类核苷酸，如图 2 所示，核苷酸上同时具有荧光染料和阻断基团，其中，A,T,G,C 分别表示腺嘌呤核苷酸、胸腺嘧啶核苷酸、鸟嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸。

表 1 dNTP 1 混合液配方表

dNTP 1 混合液	终浓度 (nmol/L)
dCTP_1	100
dGTP_1	100
dATP_1	100
dTTP_1	100

表中，dCTP_1 是指同时具有阻断修饰和荧光修饰的胞嘧啶核苷酸，dGTP_1 是指同时具有阻断修饰和荧光修饰的鸟嘌呤核苷酸，dATP_1 是指同时具有阻断修饰和荧光修饰的腺嘌呤核苷酸，dTTP_1 是指同时具有阻断修饰和荧光修饰的胸腺嘧啶核苷酸。

(3) 按照表 2 配方配置 dNTP 2 混合液，即第二类核苷酸；本例的第二类核苷酸，如图 1 所示，核苷酸上仅具有阻断基团，没有荧光染料，其中，A,T,G,C 分别表示腺嘌呤核苷酸、胸腺嘧啶核苷酸、鸟嘌呤核苷酸、胞嘧啶核苷酸。

表 2 dNTP 2 混合液配方表

dNTP 2 混合液	终浓度 (nmol/L)
dCTP_2	100
dGTP_2	100
dATP_2	100
dTTP_2	100

表中，dCTP_2 是指仅具有阻断修饰的胞嘧啶核苷酸，dGTP_2 是指仅具有阻断修饰的鸟嘌呤核苷酸，dATP_2 是指仅具有阻断修饰的腺嘌呤核苷酸，dTTP_2 是指仅具有阻断修饰的胸腺嘧啶核苷酸。

(4) 利用 BGISEQ-500 平台，比较增加 dNTP 2 混合液来实现补充反应的

效果，再保持其他试剂不变的情况下，取出试剂盒的#5 和#6 号孔位的试剂，更换成实验组需要用到的试剂；

(5) 按照表 3 进行合成试剂 1 的配制，混合均匀后备用；

表 3 合成试剂 1 配方表

合成试剂 1	用量 (mL)
反应缓冲液	48
DNA 聚合酶	1
dNTP 1 混合液	1

(6) 按照表 4 进行合成试剂 2 的配制，混合均匀后备用；

表 4 合成试剂 2 配方表

合成试剂 2	用量 (mL)
反应缓冲液	48
DNA 聚合酶	1
dNTP 2 混合液	1

(7) 在对照组的试剂盒#5 孔位和#6 孔位分别加入等量的合成试剂 1；在实验组的试剂盒#5 孔位加入合成试剂 1，#6 孔位加入合成试剂 2，两种试剂的用量比例为 1:1。

(8) 使用 BGISEQ-500 平台进行 SE50 的测序，添加合成试剂 1 的试验组作为对照组，添加合成试剂 2 的试验组作为实验组，分别统计分析两组试验中每个循环的荧光信号变化曲线、每个循环的测序质量变化曲线以及每个循环的测序错误率变化曲线。

测序结果如图 3 至图 5 所示。其中，每个循环的荧光信号变化曲线如图 3 所示，图中，横坐标是测序读长，纵坐标是测序信号，“○”为实验组的曲线，“▲”为对照组的曲线；结果显示，随着测序循环的增加，测序的信号慢慢降低，实验组的荧光信号降低速度比对照组要慢，说明测序合成和切除更充分。

每个循环的测序质量变化曲线如图 4 所示，图中，横坐标是测序读长，纵坐标是测序质量值，“○”为实验组的曲线，“▲”为对照组的曲线；结果显示，随着测序循环的增加，测序的质量降低，实验组的测序质量值降低速度比对照组要慢，说明实验组的测序质量更高。

每个循环的测序错误率变化曲线如图 5 所示，图中，横坐标是测序读长，

纵坐标是测序错误率，“○”为实验组的曲线，“▲”为对照组的曲线；结果显示，随着测序循环的增加，测序错误率开始增加，实验组的错误率增加速度比对照组要慢，说明实验组错误率更低。

可见，在聚合测序的反应液中添加本申请的仅仅具有阻断修饰的 dNTPs，即第二类核苷酸，能够有效的提高测序质量，降低测序错误率。

以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明，不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本申请构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本申请的保护范围。

权 利 要 求 书⁷

1.一种提高核酸聚合测序质量的方法，其特征在于：包括在聚合测序的反应液中加入第二类核苷酸，所述第二类核苷酸的 3'糖羟基具有阻断修饰但没有荧光修饰。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述第二类核苷酸的用量，与反应液中第一类核苷酸的用量相同，所述第一类核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸。

3.根据权利要求 1 或 2 所述的方法在核酸测序中的应用。

4.根据权利要求 3 所述的核酸包含 DNA 或 RNA。

5.根据权利要求 1 或 2 所述的方法在人类基因组、动物、植物和/或微生物核酸测序中的应用。

6.一种核酸测序方法，其特征在于：包括在边合成边测序的过程中，于其反应液中同时添加两类核苷酸，第一核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸，第二类核苷酸为 3'糖羟基仅具有阻断修饰但没有荧光修饰的核苷酸。

7.一种提高核酸测序质量的反应体系，包括用于边合成边测序的反应液，其特征在于：所述反应液中添加有第二类核苷酸，所述第二类核苷酸的 3'糖羟基具有阻断修饰但没有荧光修饰。

8.根据权利要求 7 所述的反应体系，其特征在于：所述反应液包括反应缓冲液、DNA 聚合酶和第一类核苷酸，所述第一类核苷酸为 3'糖羟基同时具有阻断修饰和荧光修饰的核苷酸。

9.一种含有权利要求 7 或 8 所述的反应体系的核酸测序试剂盒。

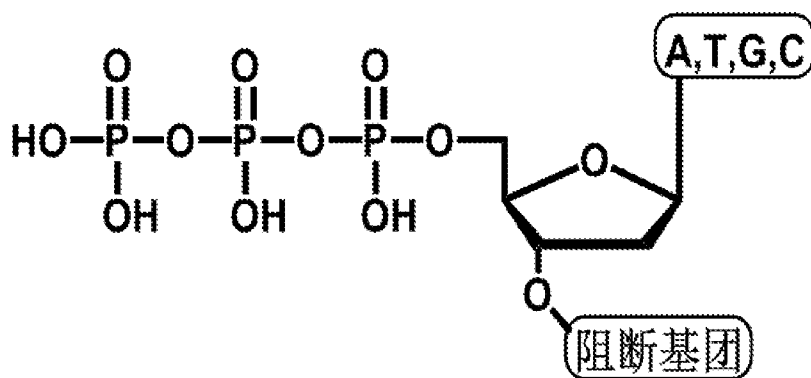


图 1

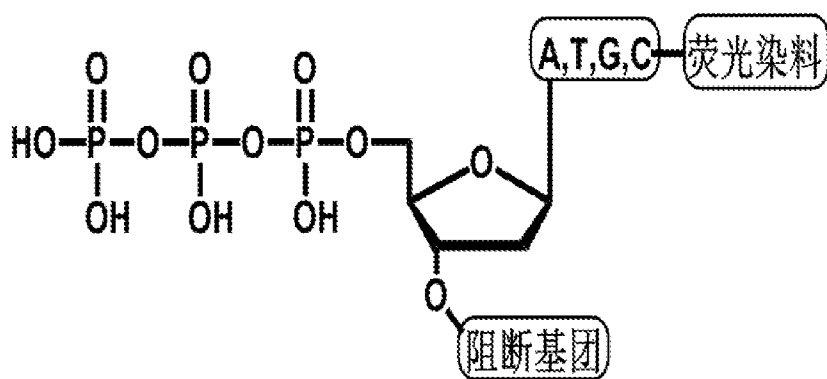


图 2

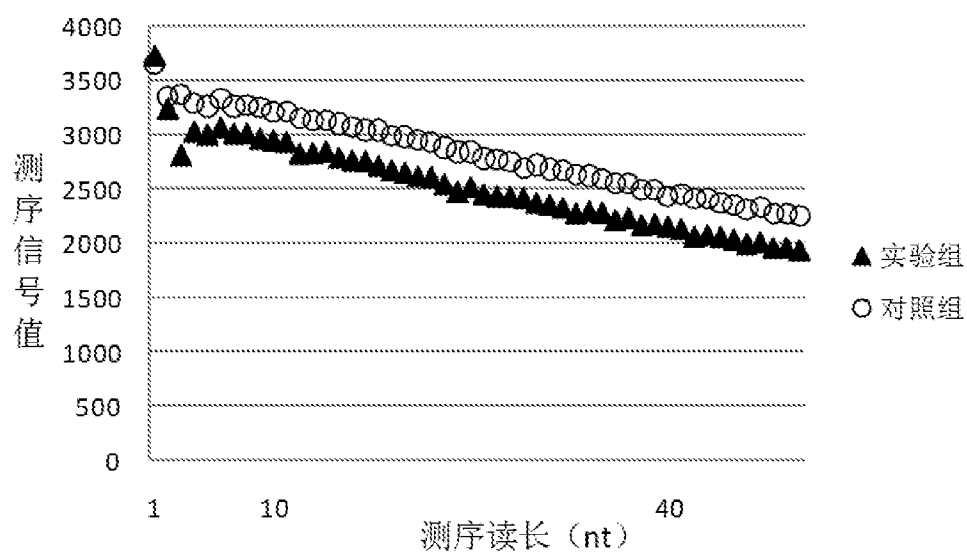


图 3

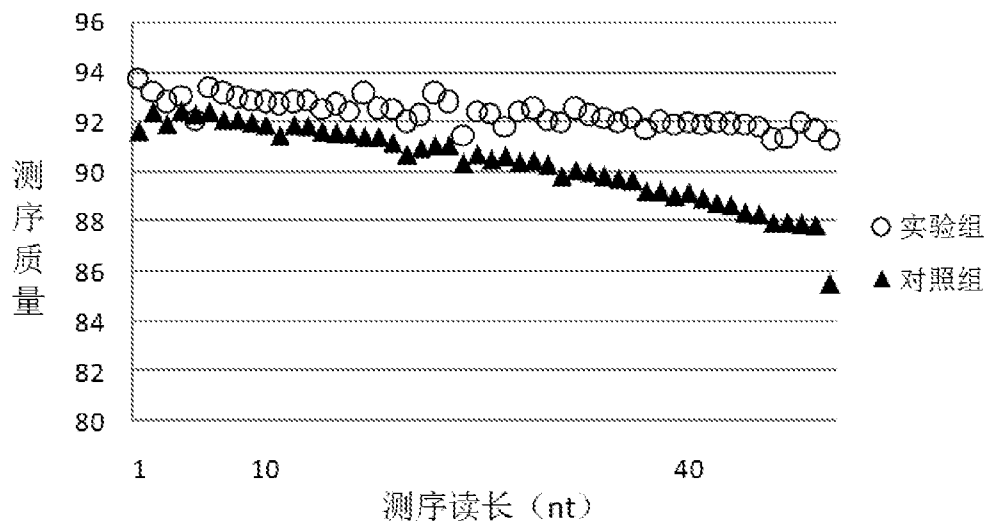


图 4

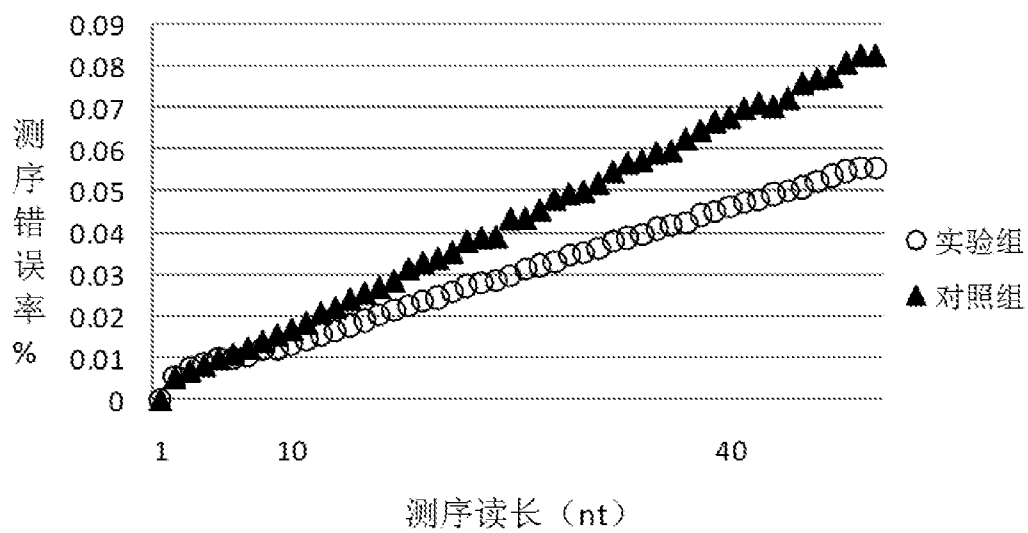


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/070711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (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

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)

CNKI, WANFANG, CNABS, CNTXT, TWXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, NCBI, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOGLE SCHOLAR: 聚合测序, 边合成边测序, 阻断, 荧光, 无, 没有, 不含, 不包括, 第二代测序, 核苷酸, 第二核苷酸, 第二类核苷酸, 混合, 单修饰, 双修饰, sequencing by synthesis, blocking, fluorophore, fluorescence, fluor, non, no, not, modified

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102030792 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 27 April 2011 (27.04.2011), see entire document, particularly abstract, and description, paragraph [0008]	1-9
A	CN 103602719 A (BEIJING MYGENOSTICS CO., LTD.), 26 February 2014 (26.02.2014), see entire document, particularly description, paragraphs [0022] and [0027]	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 09 October 2017	Date of mailing of the international search report 20 October 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 TIAN, Yuan Telephone No. (86-10) 62411047
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/070711

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102030792 A	27 April 2011	US 2011076679 A1	31 March 2011
		EP 2305835 A1	06 April 2011
		US 8030466 B2	04 October 2011
		KR 20110034838 A	06 April 2011
		EP 2305835 B1	19 December 2012
		KR 101107315 B1	20 January 2012
		CN 102030792 B	24 September 2014
CN 103602719 A	26 February 2014	CN 103602719 B	08 June 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/070711

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CNKI, WANFANG, CNABS, CNTXT, TWTXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, NCBI, ISI-WEB OF KNOWLEDGE, GOOG-LE SCHOLAR: 聚合测序, 边合成边测序, 阻断, 荧光, 无, 没有, 不含, 不包括, 第二代测序, 核苷酸, 第二核苷酸, 第二类核苷酸, 混合, 单修饰, 双修饰, sequencing by synthesis, blocking, fluorophore, fluorescence, fluor, non, no, not, modified

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102030792 A (韩国科学技术研究院) 2011年 4月 27日 (2011 - 04 - 27) 参见全文, 特别是摘要, 说明书第 [0008] 段	1-9
A	CN 103602719 A (北京迈基诺基因科技有限责任公司) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 参见全文, 特别是说明书第 [0022] 和 [0027] 段	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 10月 9日

国际检索报告邮寄日期

2017年 10月 20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

受权官员

田园

电话号码 (86-10)62411047

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/070711

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	102030792	A	2011年 4月 27日	US	2011076679	A1	2011年 3月 31日
				EP	2305835	A1	2011年 4月 6日
				US	8030466	B2	2011年 10月 4日
				KR	20110034838	A	2011年 4月 6日
				EP	2305835	B1	2012年 12月 19日
				KR	101107315	B1	2012年 1月 20日
				CN	102030792	B	2014年 9月 24日
CN	103602719	A	2014年 2月 26日	CN	103602719	B	2016年 6月 8日