

(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
2020 年 6 月 4 日 (04.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/107564 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/00 (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/122064

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 19 日 (19.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811435510.6 2018 年 11 月 28 日 (28.11.2018) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 李翔 (LI, Xiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 杨海洋 (YANG, Haiyang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 钱政江 (QIAN, Zhengjiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层, Beijing 100036 (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,

JO, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: SMALL MOLECULE PROTEIN FOR INDICATING CALCIUM IONS AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用

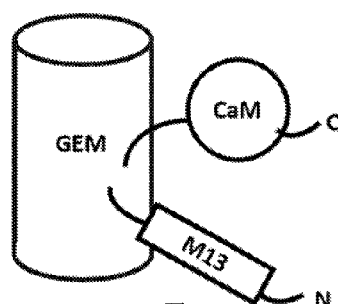


图 1

(57) Abstract: Provided herein a small molecule protein for indicating calcium ions and uses thereof. The amino acid sequence of said small molecule protein is shown in SEQ ID NO.1 The small molecule protein named GEM is fused with calmodulin (CaM) and myosin light chain kinase M13, and can be used for recording brain activity in freely moving animals using calcium imaging technology.

(57) 摘要: 本申请提供了一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用, 所述小分子蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。本申请所述的小分子蛋白质, 命名为 GEM, 与钙调蛋白 (CaM) 和肌球蛋白轻链激酶 M13 融合, 能够用于记录自由活动的实验动物脑内活动的钙成像技术。

WO 2020/107564 A1

一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用

技术领域

本申请涉及生物领域，尤其涉及一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用。

背景技术

钙成像技术 (calcium imaging) 是指利用钙离子指示剂检测组织细胞内钙离子浓度的方法。在生物有机体内，钙离子产生各种各样的胞内信号，这些胞内信号几乎在每种类型的细胞中都存在，在很多功能方面有很重要的作用，例如心肌细胞收缩的控制等。在哺乳动物的神经系统中，钙离子是一类重要的神经元胞内信号分子。在静息状态下，大多数神经元的胞内钙离子浓度约为 50-100nM，当神经元兴奋时，胞内钙离子浓度能上升 10-100 倍，钙离子浓度的升高对于神经递质的释放过程是必不可少的。总的来说神经元的活动与其内部的钙离子浓度密切相关，神经元在放电的时候会爆发出一个短暂的钙离子浓度高峰。根据钙离子浓度与神经元活动之间的严格对应关系，利用特殊的荧光染料或者蛋白质荧光探针，将神经元中的钙离子浓度通过荧光强度表现出来，这样就可以做到检测神经元活动的目的，而这一技术即为神经元钙成像技术。

目前，钙成像所用的钙离子指示剂主要有两大类：一类是化学性钙离子指示剂。另一类为基因编码的钙离子指示剂。化学性钙离子指示剂一般指的是可以螯合钙离子的小分子。而目前基因编码的钙离子指示剂主要是来自于绿色荧光蛋白 (GFP) 及其变异体 (例如 YFP、CFP 等) 的荧光蛋白，与钙调蛋白 (CaM) 和肌球蛋白轻链激酶 M13 融合。现在目前使用较为广泛的基因编码的钙离子指示剂有：GCaMP、Pericams 和 TN-XXL 等，其中 GCaMP 由于其超强的灵敏度，

现在被广泛应用于在体钙成像研究。

CN101372482 公开了结一种荧光素类钙离子荧光指示剂，其中 R1、R2 选自氢、甲基、乙基、丙基或异丙基，合成得到的荧光素类钙离子指示剂粗品与无水甲醇酯化得到荧光素类钙离子指示剂甲酯，经柱层析分离得到酯化纯品，最后水解得到荧光素类钙离子指示剂纯品。荧光素类钙离子荧光指示剂可用于胞内游离钙离子浓度测定。目前来说，不论采用哪一类钙离子指示剂，其成像的记录过程是非常类似的。即带有钙离子指示剂的细胞可以通过荧光显微镜观测，然后通过 CCD 摄像机捕捉、记录图像。由于离体实验本身的限制，现在越来越多的神经科学家等科研人员更倾向于获得在体的钙成像实验，因为在体实验能更加准确并且更能反映生理状况的数据。为了达到在体实时观测体内钙成像这个目的，钙离子成像技术必须借助双光子显微镜来完成。虽然这几年双光子显微镜技术发展较为迅速，但其具有几个非常致命的缺陷：

首先，操作十分繁琐，钙成像结合双光子观察实验动物脑内钙活动时，需要对实验动物做提前处理，例如打磨动物头骨等，以达到更好的成像效果；其次，现有的钙成像技术受限于显微镜的视野，只能对脑内很小的一片区域进行记录。而神经系统的正常运作是由许多不同的脑区相互协作，因此对于这些过程的研究需要对整个中枢神经系统甚至外周神经系统进行细致全面的观测分析，而目前的钙成像技术确达不到这个要求；第三，由于目前钙成像技术的成像需借助双光子显微镜，其成像的光路极为稳定单一，因此需要科研人员把实验动物固定起来才能成像，而这种情况下脑内的活动与动物正常自由状态下的脑内活动具有极大的差别，所获得的数据也是不准确的。

因此，神经科学领域迫切需要一种能够兼顾全局和微观、并且能够记录到真正意义上自由活动的实验动物脑内活动的钙成像技术，研发一种新型基因编

码的小分子蛋白质，作为钙离子指示剂，具有广阔的应用前景和巨大的市场价值。

发明内容

针对现有技术的不足及实际的需求，本申请提供一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用，所述小分子蛋白质通过与钙调蛋白（CaM）和肌球蛋白轻链激酶 M13 融合（即利用 GEM 取代现有 GCaMP 中的荧光蛋白），能解决现有钙成像技术中的众多缺陷，作为一种钙离子指示剂，具有广阔的应用前景和巨大的市场价值。

为达此目的，本申请采用以下技术方案：

第一方面，本申请提供一种用于指示钙离子的小分子蛋白质，所述小分子蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

所述 SEQ ID NO.1 如下：

MRRRQRASRAGVVARRATPGDAQANSGRAPARPFQSFSNGAMLMNK
QIVAGIVAGLVSMSSHAQLGQLFQSVKEQVTQAATSQVNQGVRSATDEAVQA
TSSRTRKAINSVRSPSSAAAATSTSPSAAEETNDATLSEARK.

优选地，所述小分子蛋白质的亲和金属离子包括 2 价锰离子。

优选地，所述小分子蛋白质的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示：

ATGGGTGTAGTCGCACGAAGAGCTACACCCGGTGACGCACAAGCCAA
CTCAGGTAGAGCTCCCGCCCCGGCCATTTTCAGTCTTTTGTGTCAAACGGAGC
CATGCTGATGAACAAGCAAATTGTGGCTGGGATAGTTGCAGGTCTGGTCA
GCATGTCCTCCACGCACAGCTCGGTCAACTCTTCCAGTCTGTTAAGGAAC
AGGTCACCTCAGGCAGCAACCTCTCAGGTAAATCAAGGAGTAAGGTCCGCT
ACTGACGAAGCCGTGCAAGCAACATCTAGTCGGACCAGAAAGGCCATTAA

CAGTGTTAGGTCCCCCTCAAGCGCAGCAGCCGCTACTTCTACAAGCCCTTC
TGCTGCCGAGGAGACTAATGACGCTACCCTGAGTGAGGCCCGCAAATAA.

优选地，所述小分子蛋白质的分子量小于 15KD。

本申请中，申请人经过复杂实验验证，所述小分子蛋白质在体内可以结合锰离子，锰离子是一种顺磁性物质，在核磁共振成像(MRI)时，结合了锰离子的 GEM 蛋白在 T1 加权像下呈现高信号，根据这一原理，本申请将 GEM 取代现有 GCaMP 融合蛋白中的荧光蛋白 GFP(或 YFP、CFP)，在脑内表达后，借助核磁共振成像技术，可以通过 T1 加权像下信号的变化从而可以做到实时在体的检测动物体内钙离子水平的变化，达到监测神经元活动的目的。

本申请要求保护上述基因序列，但不局限于此，在此基础上所做的基因突变和改造都属于本申请的保护点。

第二方面，本申请提供一种质粒，所述质粒包括编码第一方面所述的小分子蛋白质的核苷酸序列。

第三方面，本申请提供一种慢病毒，所述慢病毒通过第二方面所述的质粒和辅助质粒共转染包装得到。

第四方面，本申请一种如第一方面所述的小分子蛋白质、第二方面所述的质粒或第三方面所述的慢病毒用于指示钙离子的用途。

本申请提供了一种基因编码的指示剂，虽然发挥作用的是蛋白质，但是本质是一种 DNA 工具，蛋白的表达是在生物体内自行完成。

第五方面，本申请提供一种钙离子成像方法，所述方法采用第一方面所述的小分子蛋白质、第二方面所述的质粒或第三方面所述的慢病毒中的任意一种或至少两种的组合进行核磁共振成像。

本申请提供了一种基因编码的小分子蛋白质，命名为 GEM，与钙调蛋白

(CaM)和肌球蛋白轻链激酶 M13 融合(即利用 GEM 取代现有 GCaMP 中的荧光蛋白),能解决现有钙成像技术中的众多缺陷,实现了一种能够兼顾全局和微观、并且能够记录到真正意义上自由活动的实验动物脑内活动的钙成像技术。

本申请专利并不局限于某一形式融合改造,凡是在此基础上开发的钙离子成像技术都属于本申请的保护范围

本申请的使用并不局限于中枢神经系统的使用,外周神经系统,血液循环化系统等的使用范畴都属于本申请技术的保护范围。

与现有技术相比,本申请具有如下有益效果:

本申请提供的小分子蛋白质基因序列明确,分子量较小,对于后续的优化改进更容易操作;本申请利用核磁共振技术对钙离子变化成像,克服了现有钙成像技术中双光子显微镜视野的局限性,因此能兼顾全局和微观的检测脑内神经元电活动;本申请在进行钙成像时不需要对实验动物进行固定,能做到真正意义上 Free-moving 状态下的神经元电活动,数据更为准确;由于核磁成像技术没有组织穿透性的限制,因此不需要对实验动物进行预处理,大大节约了实验周期、人力物力等。

附图说明

图 1 为本申请的 M13-GEM-CaM 结构示意图;

图 2 为本申请的 7.0T MRI 扫描结果,其中图 2 (A) 为冠状面的 T1 成像结果图,图 2 (B) 为冠状面的 T2 成像结果图,图 2 (C) 为水平面的 T1 成像结果图,图 2 (D) 为水平面的 T2 成像结果图,图 2 (E) 为矢状面的 T1 成像结果图,图 2 (F) 为矢状面的 T2 成像结果图。

具体实施方式

为更进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果,以下结合附图并通过

具体实施方式来进一步说明本申请的技术方案，但本申请并非局限在实施例范围内。

实施例 1 质粒构建

GEM 核心核苷酸序列；

ATGGGTGTAGTCGCACGAAGAGCTACACCCGGTGACGCACAAGCCAA
CTCAGGTAGAGCTCCCGCCCCGGCCATTTCAGTCTTTTGTGTCAAACGGAGC
CATGCTGATGAACAAGCAAATTGTGGCTGGGATAGTTGCAGGTCTGGTCA
GCATGTCCTCCCACGCACAGCTCGGTCAACTCTTCCAGTCTGTTAAGGAAC
AGGTCACCTCAGGCAGCAACCTCTCAGGTAAATCAAGGAGTAAGGTCCGCT
ACTGACGAAGCCGTGCAAGCAACATCTAGTCGGACCAGAAAGGCCATTAA
CAGTGTTAGGTCCCCCTCAAGCGCAGCAGCCGCTACTTCTACAAGCCCTTC
TGCTGCCGAGGAGACTAATGACGCTACCCTGAGTGAGGCCCGCAAATAA

此段 DNA 序列为设计改造后的核心序列，经过验证可以在动物体内结合锰离子，在核磁共振成像下会呈现高信号，本申请即是利用此原理采用此段序列代替传统钙离子成像蛋白中的荧光蛋白；由于此段 DNA 序列为设计改造的，因此需要人工合成得到；

通用钙调蛋白 CaM 以及肌球蛋白轻链 M13 DNA 序列合成并连接至核心序列 GEM 的 C 端和 N 末端，见图 1；这种模式为经典的 GCaMP 的结构模式，已经过验证，为目前最常用的基因编码钙离子指示剂；

而本申请利用原有的结构框架，并用改造设计的 GEM 序列代替原有的荧光序列 GFP，因此在本申请中验证 GEM 的 MRI 的信号效果即可；图 1 所示中钙调蛋白 CaM 是一种能与钙离子结合的蛋白质，肌球蛋白轻链 M13 能与钙调蛋白 GaM 结合，当在体内结合钙离子时，由于 Ca^{2+} -CaM-M13 相互作用，构象改变

会导致核心蛋白 GEM 的构象改变，从而会导致其在 MRI 成像时信号发生变化，从而可以监视体内钙离子水平变化。

完整质粒构建：将 M13-GEM-CaM 插入载体 pET32a 中，其中酶切位点分别选用为 NcoI/NotI，其中载体的选择以及酶切位点的选择并不会影响本申请的核心作用，可以根据实际不同需要选择。

实施例 2 实验检测

脑内病毒微量注射：

本申请选择大鼠纹状体脑区进行验证（纹状体这一核团相对比较大，比较均一，各向同性比较好，其他脑区也可以作为实验脑区）；成年大鼠经水合氯醛腹腔注射麻醉后，将大鼠俯卧固定于立体定位上，头皮正中切开并分离骨膜；根据大鼠脑图谱中纹状体核团的位置（A/P 0.6，M/L 3.0，D/V 5.2）用颅钻在颅骨开一小孔，用 10 微升微量注射针向纹状体脑区缓慢注射 2000nL 的慢病毒，进样速度 100nL/min，注射完毕后，停针 5min，缓慢移除针头；

在病毒注射后 5-6 周后，对大鼠进行麻醉后进行 MRI(uMR790, Shanghai United Imaging Healthcare)扫描，采用立体像素分辨率为 0.25*0.25*1.5mm 的三维磁化强度预备梯度回波序列，采集大鼠全脑冠状面、水平面的 T1 加权图像，每个面扫描 4-6 分钟。

结果见图 2（A）-图 2（F），GEM 能并且只在 T1 加权成像下呈现信号。

综上所述，本申请提供一种用于指示钙离子的小分子蛋白质及其应用，命名为 GEM，与钙调蛋白（CaM）和肌球蛋白轻链激酶 M13 融合，能解决现有钙成像技术中的众多缺陷，采用本申请提供的小分子蛋白质能实现一种新的兼顾全局和微观、并且能够记录到真正意义上自由活动的实验动物脑内活动的钙成像技术，具有广阔的应用前景和巨大的市场价值。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法，但本申请并不局限于上述详细方法，即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

- 1、一种用于指示钙离子的小分子蛋白质，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。
- 2、根据权利要求 1 所述的小分子蛋白质，其中，所述小分子蛋白质的亲和金属离子包括 2 价锰离子。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的小分子蛋白质，其中，所述小分子蛋白质的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
- 4、一种质粒，其包括编码权利要求 1-3 中任一项所述的小分子蛋白质的核苷酸序列。
- 5、一种慢病毒，其通过权利要求 4 所述的质粒和辅助质粒共转染包装得到。
- 6、如权利要求所述 1-3 中任一项所述的小分子蛋白质、权利要求 4 所述的质粒或权利要求 5 所述的慢病毒用于指示钙离子的用途。
- 7、一种钙离子成像方法，其采用权利要求 1-3 中任一项所述的小分子蛋白质、权利要求 4 所述的质粒或权利要求 5 所述的慢病毒中的任意一种或至少两种的组合进行核磁共振成像。

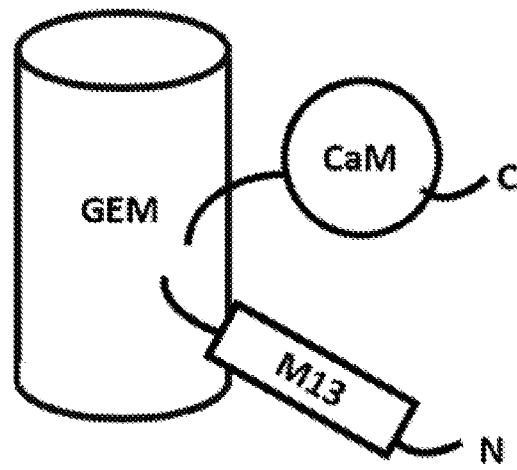


图 1

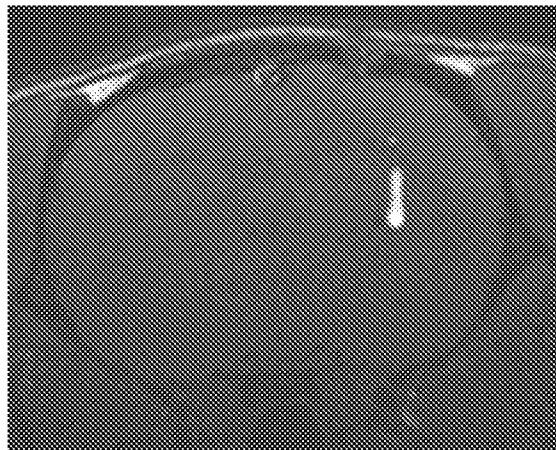


图 2 (A)

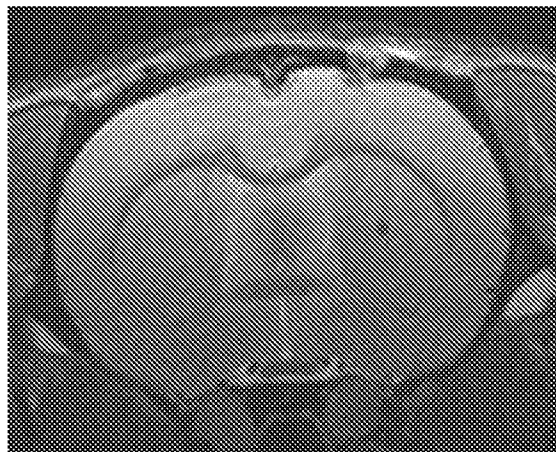


图 2 (B)

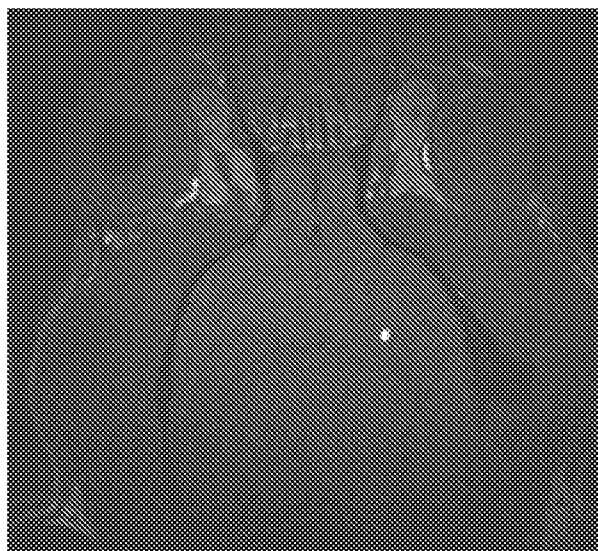


图 2 (C)

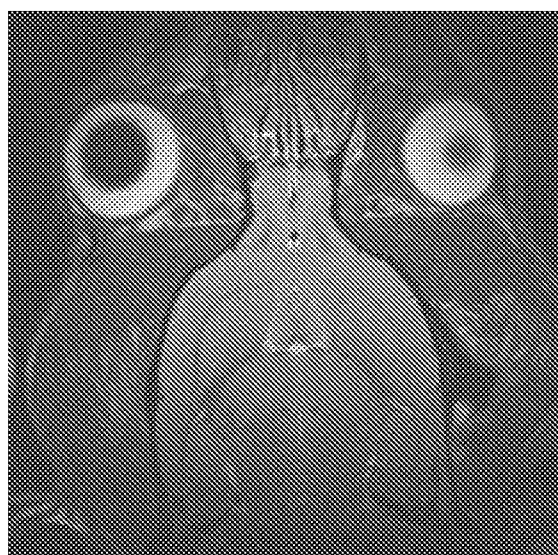


图 2 (D)

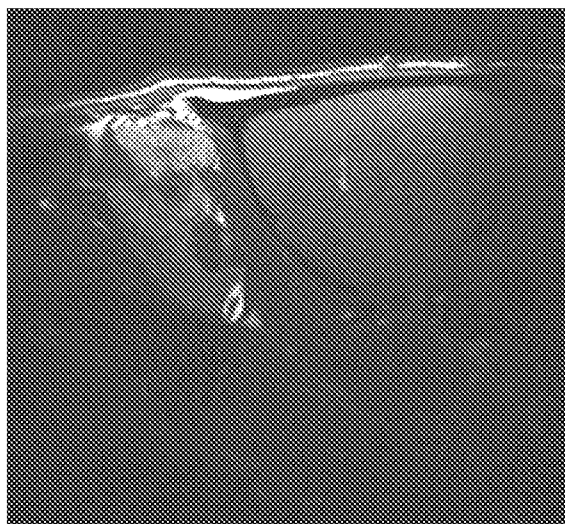


图 2 (E)



图 2 (F)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12Q 1/00(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)

C07K; C12N; 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)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA: 钙离子, 指示剂, 磁共振成像, 钙调蛋白, 肌球蛋白轻链激酶, GEM, calcium ion, indicator, Magnetic Resonance Imaging, MRI, Calmodulin, CaM, Myosin Light Chain Kinase, MLCK, M13等; 中国专利生物序列检索系统; China Patents Biological Sequence Search System, Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-2等, STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1 and 2 et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 16 May 2013 (2013-05-16), see part ORIGIN	1, 2, 4, 5
A	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 16 May 2013 (2013-05-16), see part ORIGIN	3, 6, 7
A	CN 107987171 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 04 May 2018 (2018-05-04) see entire document	1-7
A	CN 106687588 A (JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY AGENCY) 17 May 2017 (2017-05-17) see entire document	1-7
A	EP 1238982 A1 (RIKEN) 11 September 2002 (2002-09-11) see entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

28 April 2019

Date of mailing of the international search report

28 June 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/122064

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107987171	A	04 May 2018	None			
CN	106687588	A	17 May 2017	EP	3156482	A1	19 April 2017
				JP	WO2015190083	A1	20 April 2017
				US	2017152295	A1	01 June 2017
				EP	3156482	A4	22 November 2017
				JP	6462684	B2	30 January 2019
				WO	2015190083	A1	17 December 2015
				CA	2951780	A1	17 December 2015
EP	1238982	A1	11 September 2002	US	2005208624	A1	22 September 2005
				US	2003004306	A1	02 January 2003
				JP	2002253261	A	10 September 2002

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/122064

A. 主题的分类 C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12Q 1/00(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) C07K; C12N; 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)) CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA和检索词: 钙离子, 指示剂, 磁共振成像, 钙调蛋白, 肌球蛋白轻链激酶, GEM, calcium ion, indicator, Magnetic Resonance Imaging, MRI, Calmodulin, CaM, Myosin Light Chain Kinase, MLCK, M13等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-2等																				
C. 相关文件 <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>"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分</td> <td>1-2、4-5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分</td> <td>3、6-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107987171 A (清华大学) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106687588 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 1238982 A1 (RIKEN) 2002年 9月 11日 (2002 - 09 - 11) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分	1-2、4-5	A	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分	3、6-7	A	CN 107987171 A (清华大学) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 参见全文	1-7	A	CN 106687588 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文	1-7	A	EP 1238982 A1 (RIKEN) 2002年 9月 11日 (2002 - 09 - 11) 参见全文	1-7
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分	1-2、4-5																		
A	"NCBI Reference Sequenc: WP_011401419.1" NCBI, 2013年 5月 16日 (2013 - 05 - 16), 参见 "ORIGIN" 部分	3、6-7																		
A	CN 107987171 A (清华大学) 2018年 5月 4日 (2018 - 05 - 04) 参见全文	1-7																		
A	CN 106687588 A (国立研究开发法人科学技术振兴机构) 2017年 5月 17日 (2017 - 05 - 17) 参见全文	1-7																		
A	EP 1238982 A1 (RIKEN) 2002年 9月 11日 (2002 - 09 - 11) 参见全文	1-7																		
☐ 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 2019年 4月 28日		国际检索报告邮寄日期 2019年 6月 28日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(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 何睿 电话号码 (86-10)-62411106																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/122064

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	107987171	A	2018年 5月 4日	无			
CN	106687588	A	2017年 5月 17日	EP	3156482	A1	2017年 4月 19日
				JP	W02015190083	A1	2017年 4月 20日
				US	2017152295	A1	2017年 6月 1日
				EP	3156482	A4	2017年 11月 22日
				JP	6462684	B2	2019年 1月 30日
				WO	2015190083	A1	2015年 12月 17日
				CA	2951780	A1	2015年 12月 17日
EP	1238982	A1	2002年 9月 11日	US	2005208624	A1	2005年 9月 22日
				US	2003004306	A1	2003年 1月 2日
				JP	2002253261	A	2002年 9月 10日