

(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
2023 年 5 月 11 日 (11.05.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/077720 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/686 (2018.01) *C12Q 1/48* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/086204

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 12 日 (12.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111296052.4 2021 年 11 月 3 日 (03.11.2021) CN

(71) 申请人: 深圳铭毅智造科技有限公司 (ME INSTRUMENTS INC.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市坪山区坪山街道和平社区兰金四路 19 号华瀚科技工业园厂房 2 栋 321, Guangdong 518000 (CN)。

(72) 发明人: 周蓉 (ZHOU, Rong); 中国广东省深圳市坪山区坪山街道和平社区兰金四路 19 号华瀚科技工业园厂房 2 栋 321, Guangdong 518000 (CN)。
王攀 (WANG, Pan); 中国广东省深圳市坪山区坪山街道和平社区兰金四路 19 号华瀚科技工业园厂房 2 栋 321, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市科冠知识产权代理有限公司 (SHENZHEN KEGUAN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国广东省深圳市坪山区坪山街道六联社区坪山大道 2007 号创新广场 C1613-1616 室, Guangdong 518000 (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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING ACTIVITY OF NUCLEIC ACID-METABOLIZING ENZYME

(54) 发明名称: 一种核酸代谢酶活性检测方法

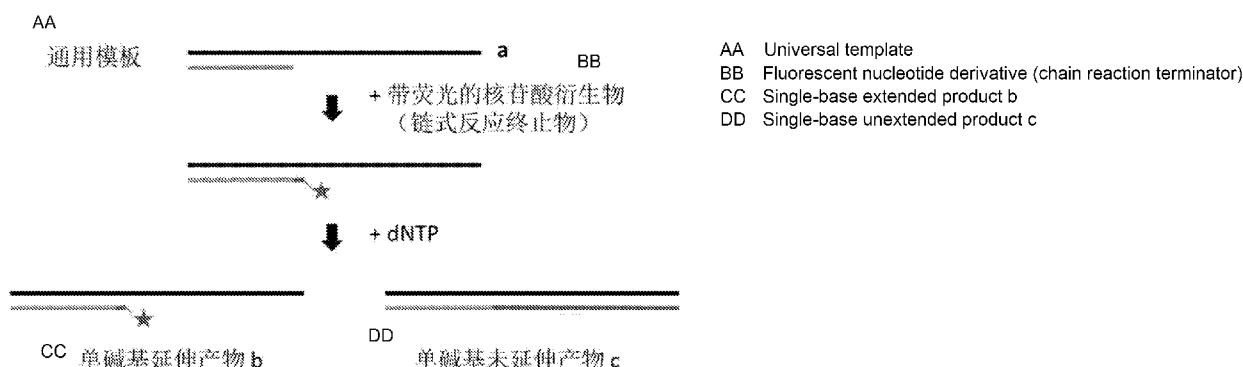


图 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a method for detecting the activity of a nucleic acid-metabolizing enzyme, comprising the following steps: S1. artificially synthesizing a single-stranded nucleic acid fragment and a primer complementary from the 3' end, and forming a template by means of an annealing reaction; S2. reacting the template with a reaction buffer solution, a fluorescently-modified nucleotide derivative or fluorescently-modified nucleotide derivative analog, and a nucleic acid-metabolizing enzyme to be detected, and performing purification to obtain a primary purified product; S3. reacting the primary purified product with a Taq reaction buffer solution, dNTP, and Taq DNA polymerase, and performing purification to obtain a secondary purified product; S4. analyzing the secondary purified product by using a capillary electrophoresis instrument; and S5. creating a standard curve, and substituting the result in S4 into the standard curve to obtain a detection result.

(57) 摘要: 本发明公开了一种核酸代谢酶活性检测方法, 其步骤如下: S1, 人工合成一条单链核酸片段和一段从 3' 端互补的引物, 通过退火反应形成模板; S2, 将模板、反应缓冲液、荧光修饰的核苷酸衍生物或荧光修饰的核苷酸衍生物类似物、待测定的核酸代谢酶进行反应并纯化得到初次纯化产物; S3, 将初次纯化产物、Taq 反应缓冲液、dNTP、Taq DNA 聚合酶进行反应并纯化得到二次纯化产物; S4, 对二次纯化产物用毛细管电泳仪分析; S5, 制作标准曲线, 将 S4 中结果代入标准曲线得出检测结果。

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

说明书

发明名称：一种核酸代谢酶活性检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，尤其是一种核酸代谢酶活性检测方法。

背景技术

[0002] 核酸代谢，包括DNA和RNA合成和降解，是所有核酸研究和相关生命科学领域研究的基础。参与DNA复制和修复的核酸代谢酶的标准活性检测方法是通过检测测量DNA或RNA的产物合成或降解放射性或荧光标记的核酸底物。例如，用同位素标记的方法，结合DNA的荧光染料法（PicoGreen或EvaGreen）均广泛应用于DNA定量，进而应用于核酸代谢酶的活性检测方法中，测定核酸代谢酶的合成活性或者降解活性。为了更好地研究反应中间体或副产物，更全面的捕获反应途径的具体步骤和细节，全面了解核酸酶的活性，聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）被广泛的应用于分析底物，中间体的大小分布等实验研究中，对核酸酶进行进一步的表征和标准测定，但聚丙烯酰胺凝胶电泳的分析方法相对于前述的放射性或荧光标记法，存在着实验时间长效率低通量小等缺点，限制了核酸酶分析的范围。

发明概述

技术问题

[0003] 针对现有的不足，本发明提供一种核酸代谢酶活性检测方法。

问题的解决方案

技术解决方案

[0004] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：其步骤如下：

[0005] S1，人工合成一条单链核酸片段和一段从3'端互补的引物，通过退火反应形成核酸引物复合物，称之为模板；

[0006] S2，将模板、反应缓冲液、荧光修饰的核苷酸衍生物或荧光修饰的核苷酸衍生物类似物、待测定的核酸代谢酶加入同一个PCR管中，在PCR反应仪中反应得到

初始产物，并对初始产物进行kit纯化得到初次纯化产物；

[0007] S3，将初次纯化产物、Taq反应缓冲液、dNTP、Taq DNA聚合酶加入另一个PCR管中，在PCR反应仪中反应得到二次反应产物，并对二次反应产物进行kit纯化得到二次纯化产物；

[0008] S4，对二次纯化产物用毛细管电泳仪分析，收集分离图谱并计算出单位时间内碱基的延伸效率；

[0009] S5，制作标准曲线，将S4中并分析计算延伸效率代入标准曲线得出待测定核酸代谢酶的活性；其中步骤S2和S3中的PCR反应条件是温度为10℃—90℃，时间为10s—60min。

[0010] 作为优选，所述模板为一条单链核酸片段，其片段长度为50-150个bp。

[0011] 作为优选，所述引物长度为15-25个bp。

[0012] 作为优选，所述步骤S2的反应条件是温度为45-65℃，时间为1 min。

[0013] 作为优选，所述步骤S3的反应条件是温度为72℃，时间为20 min。

[0014] 作为优选，所述标准曲线的制备方法为，在步骤S2中将待测定的核酸代谢酶改为按照活性梯度稀释成不同浓度的已知活性的核酸代谢酶，然后依次经过S2、S3、S4步骤得出各种梯度单位活性初始斜率，并制出标准曲线。

[0015] 作为优选，所述步骤S2中，待测定的核酸代谢酶按照浓度梯度稀释成不同浓度的核酸代谢酶，然后每一个浓度的核酸代谢酶均依次经过S2、S3、S4步骤得出各浓度单位活性初始斜率，并代入标准曲线中，得出相对活性单位。

[0016] 作为优选，所述毛细管电泳仪分析依据荧光染料种类、分离图谱的峰型大小来计算的。

[0017] 作为优选，所述核酸代谢酶包括高通量的核酸代谢酶。

[0018] 作为优选，所述荧光修饰的核苷酸衍生物和荧光修饰的核苷酸衍生物类似物是在3'羟基处保护基团修饰且碱基上携带荧光标识基团的核苷酸衍生物。

发明的有益效果

有益效果

[0019] 本发明的有益效果在于：该发明操作快捷，活性检测结果准确，灵敏度高，实现了高通量的检测，可实现精确到单个核苷酸的表征精度，在高通量毛细管电

泳中，荧光标记的核酸底物，中间体和产物由大小和电荷分开，并/或通过激光激发检测，检测样品的进样，凝胶电泳和数据采集过程全部是自动化的，可实现单次实验在一小时内检测96个样品，可适用于全部模板带有或不带有荧光染料的检测，也解决了现有技术中操作步骤多、多种荧光标记设计复杂，同位素标记引起的环境污染、受仪器分辨率限制等问题。

对附图的简要说明

附图说明

[0020] 图1是本发明的原理示意图；

[0021] 图2是本发明实施例1得到的电泳图谱；

发明实施例

本发明的实施方式

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例的目的、技术方案和优点，下面将结合实施例对本发明作进一步说明，进行清楚、完整的描述，显然，所描述的实施例是本发明的部分实施例，而不是全部实施例。基于本发明的实施例，本领域普通技术人员在没有付出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明的保护范围。

[0023] 在本发明中，“延伸”意味着通过与带荧光修饰的核苷酸衍生物的5'磷酸基团形成磷酸二酯键，将所述修饰的核苷酸连接到第二个核苷酸的游离3'羟基，所述修饰的核苷酸连接到的第二个核苷酸通常出现在多核苷酸链的3'末端处。

“延伸”可以是在低温下和/或在更宽的温度范围内，可以是在短时间内和/或更宽的时间范围内，与带荧光修饰的核苷酸衍生物或类似物的反应能力。在本发明中，“延伸”可以是在使用较低浓度的带荧光修饰核苷酸或类似物作为底物时的反应能力。

[0024] 在本发明中，“荧光修饰的核苷酸衍生物衍生物”和“荧光修饰的核苷酸衍生物类似物”是指已在3'糖羟基处保护基团修饰且碱基上携带荧光标识基团的核苷酸衍生物。这类核苷酸衍生物或类似物可以充当链式反应终止物，使得在添加dNTP后链式反应无法继续进行。这些术语可互换使用。

[0025] 在本发明中，模板优选一条长度为99个bp的单链核酸片段，引物长度优选16-1

9个bp；所采用的毛细管电泳仪是任何的能够进行核算毛细管电泳分析的仪器，比如QSEP，CE等；在反应时稀释合成的引物和模板所用的稀释液可以是灭菌纯化水或是 1XTE (pH8. 0)；发明原理如图1中所示，

[0026] 实施例 1

[0027] 单碱基延伸效率测定(毛细管电泳测定法)，

[0028] 引物和模板的设计合成：

[0029] 单链核酸序列(5' -3')：

[0030] GACCGCGACTCCAGCCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAA
GGA AACTGAATTCAAAGTCGTCGCGGGATCA (SEQ ID NO. 1)

[0031] 引物序列(5' -3')：TGATCCCGCGACGACT (SEQ ID NO. 2)

[0032] TGATCCCGCGACGACTTT (SEQ ID NO. 3) TGATCCCGCGACGACTTTG (SEQ ID NO. 4)
TGATCCCGCGACGACTTTGAATT (SEQ ID NO. 5)

[0033] 用来检测不同核酸代谢酶与不同荧光修饰的核苷酸衍生物或类似物的反应能力，将通用模板和四种不同荧光标记的核苷酸或类似物之一加入反应体系内，用于延伸反应，通过向反应体系中添加待检测活性的核酸代谢酶来启动反应，在1min内，使用毛细管电泳分析仪对在通用模板3' 末端处的一个带有荧光修饰的碱基延伸情况进行分析，通过电泳图的荧光峰面积比例进行计算，得出单位时间内的延伸效率，如图2中所示，然后通过改变加入的核酸代谢酶的浓度梯度，得到在不同浓度下，核酸代谢酶的延伸效率，代入标准曲线中即可计算出该核酸代谢酶的活性。

[0034] 实施例 2

[0035] 单碱基延伸错误测定(毛细管电泳测定法)

[0036] 引物和模板的设计合成：

[0037] 单链核酸序列(5' -3')：

[0038] GACCGCGACTCCAGCCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAA
GGA AACTGAATTCAAAGTCGTCGCGGGATCA (SEQ ID NO. 1)

[0039] 引物序列(5' -3')：TGATCCCGCGACGACT (SEQ ID NO. 2)

TGATCCCGCGACGACTTT (SEQ ID NO. 3)

[0040] TGATCCCGCGACGACTTTG (SEQ ID NO. 4)

[0041] TGATCCCGCGACGACTTTGAATT (SEQ ID NO. 5)

[0042] 用来检测不同核酸代谢酶与不同荧光修饰的核苷酸衍生物的反应能力，将通用模板和四种不同荧光标记的核苷酸之一（不与模板匹配的错误的核苷酸）加入反应体系内，用于延伸反应，通过向反应体系中添加待检测活性的核酸代谢酶来启动反应，在1min内，使用毛细管电泳分析仪对在通用模板3'末端处的一个带有荧光修饰的碱基延伸情况进行分析，通过电泳图的荧光峰面积比例进行计算，得出单位时间内掺入错误核苷酸的延伸效率。

[0043] 应当理解的是，对本领域普通技术人员来说，可根据上述说明加以改进或变换，而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：其步骤如下：S1，人工合成一条单链核酸片段和一段从 3' 端互补的引物，通过退火反应形成核酸引物复合物，称之为模板；S2，将模板、反应缓冲液、荧光修饰的核苷酸衍生物或荧光修饰的核苷酸衍生物类似物、待测定的核酸代谢酶加入同一个PCR管中，在PCR反应仪中反应得到初始产物，并对初始产物进行kit纯化得到初次纯化产物；S3，将初次纯化产物、Taq反应缓冲液、dNTP、Taq DNA聚合酶加入另一个PCR管中，在PCR反应仪中反应得到二次反应产物，并对二次反应产物进行kit纯化得到二次纯化产物；S4，对二次纯化产物用毛细管电泳仪分析，收集分离图谱并计算出单位时间内碱基的延伸效率；S5，制作标准曲线，将S4中并分析计算延伸效率代入标准曲线得出待测定核酸代谢酶的活性；其中步骤S2和S3中的PCR反应条件是温度为10℃—90℃，时间为10s—60min。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述模板为一条单链核酸片段，其片段长度为 50-150个bp。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述引物长度为15-25个bp。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述步骤S2的反应条件是温度为45-65℃，时间为1 min。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述步骤S3的反应条件是温度为72℃，时间为20 min。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述标准曲线的制备方法为，在步骤S2中将待测定的核酸代谢酶改为按照活性梯度稀释成不同浓度的已知活性的核酸代谢酶，然后依次经过S2、S3、S4步骤得出各种梯度单位活性初始斜率，并制出标准曲线。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法，其特征在于：所述步骤S2中，待测定的核酸代谢酶按照浓度梯度稀释成不同浓度的核酸代

谢酶，然后每一个浓度的核酸代谢酶均依次经过S2、S3、S4步骤得出各浓度单位活性初始斜率，并代入标准曲线中，得出相对活性单位。

[权利要求 8] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法, 其特征在于:所述毛细管电泳仪分析依据荧光染料种类、分离图谱的峰型大小来计算的。

[权利要求 9] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法, 其特征在于:所述核酸代谢酶包括高通量的核酸代谢酶。

[权利要求 10] 根据权利要求1所述核酸代谢酶活性检测方法, 其特征在于:所述荧光修饰的核苷酸衍生物和荧光修饰的核苷酸衍生物类似物是在 3' 羟基处保护基团修饰且碱基上携带荧光标识基团的核苷酸衍生物。

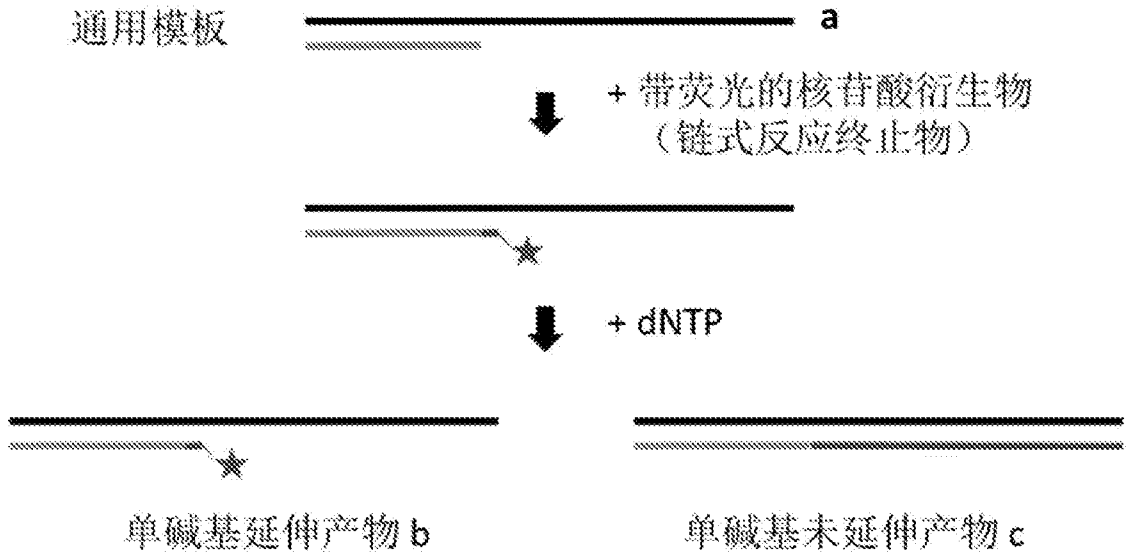


图 1

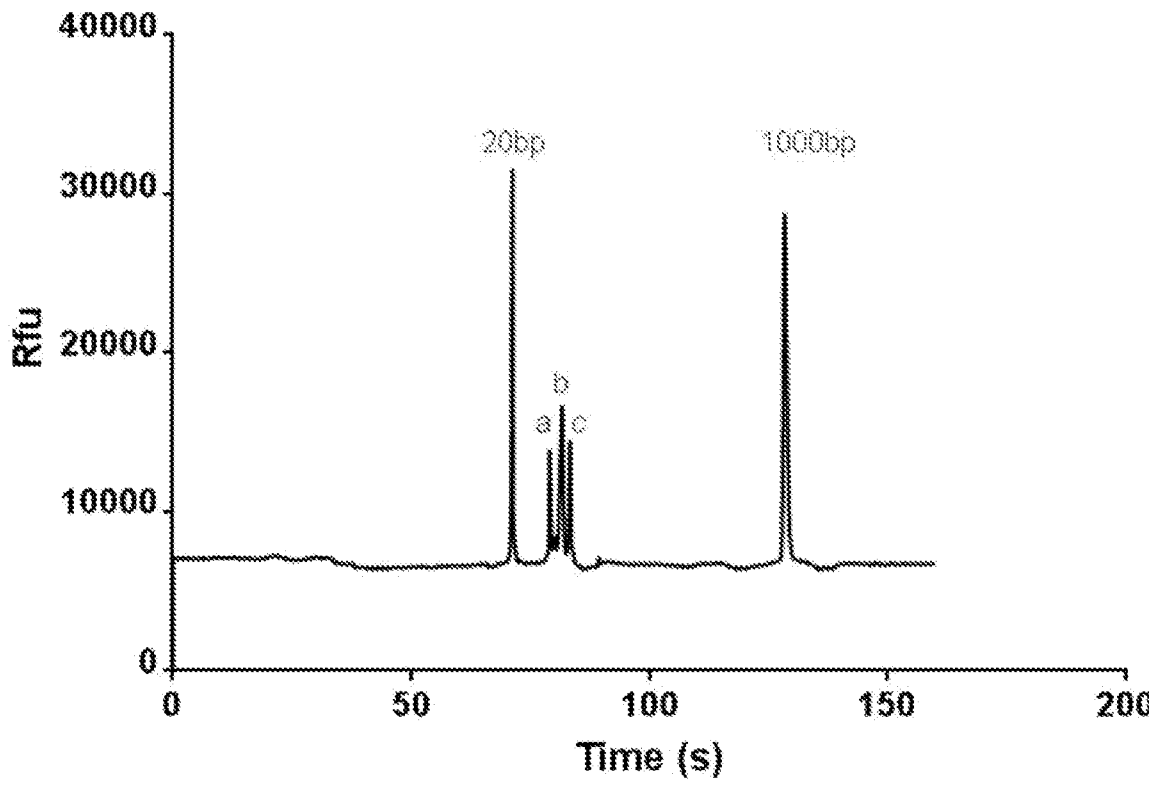


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086204

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/48(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)

CNABS, DWP, WPABSC, CNTXT, ENTXT, OETXT, WPABS, VCN, VEN, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR, WEB OF SCIENCE, PubMed: 核酸, 引物, 缓冲液, 荧光, 核酸代谢酶, DNA聚合酶, 腺苷脱氨酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸水解酶, Nucleic acid metabolizing enzymes, hydrolase, kinase, polymerase, Nucleic Acids, primers, buffer, fluorescence, adenosine, dehydrogenase, deaminase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114250281 A (SHENZHEN MINGYI INTELLIGENT MANUFACTURING TECHNOLOGY CO., LTD.) 29 March 2022 (2022-03-29) see entire document	1-10
A	WO 2008024052 A1 (RONNERBOL HOLDING AB et al.) 28 February 2008 (2008-02-28) see abstract, and claims 1-29	1-10
A	WO 2015058104 A1 (THE UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 23 April 2015 (2015-04-23) see abstract, and claims 1-78	1-10
A	CA 2233701 A1 (LLANDER CLAS K et al.) 19 February 1998 (1998-02-19) see abstract, and claims 1-7	1-10
A	US 2012070838 A1 (XI LEI et al.) 22 March 2012 (2012-03-22) see abstract, and claims 1-50	1-10
A	US 2006057596 A1 (KEENER WILLIAM K et al.) 16 March 2006 (2006-03-16) see abstract	1-10



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

21 July 2022

Date of mailing of the international search report

09 August 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086204

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sarah Schriek et al. "Detection of an L-amino Acid Dehydrogenase Activity in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 680" <i>Journal of Experimental Botany</i> , Vol. 60, No. 3, 12 February 2009 (2009-02-12), pages 1035-1046, see abstract	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/086204

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114250281	A	29 March 2022	None			
WO	2008024052	A1	28 February 2008	None			
WO	2015058104	A1	23 April 2015	None			
CA	2233701	A1	19 February 1998	None			
US	2012070838	A1	22 March 2012	EP	2606149	A1	26 June 2013
				US	2019194721	A1	27 June 2019
				US	2021285026	A1	16 September 2021
				WO	2012024639	A1	23 February 2012
US	2006057596	A1	16 March 2006	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/086204

A. 主题的分类

C12Q 1/686 (2018.01) i; C12Q 1/48 (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))

CNABS, DWP, WPABSC, CNTXT, ENTXTC, ENTXT, OETXT, WPABS, VCN, VEN, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed; 核酸, 引物, 缓冲液, 荧光, 核酸代谢酶, DNA聚合酶, 腺苷脱氨酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸水解酶, Nucleic acid metabolizing enzymes, hydrolase, kinase, polymerase, Nucleic Acids, primers, buffer, fluorescence, adenosine, dehydrogenase, deaminase

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
PX	CN 114250281 A (深圳铭毅智造科技有限公司) 2022年3月29日 (2022 - 03 - 29) 参见全文	1-10
A	WO 2008024052 A1 (RONNERBOL HOLDING AB等) 2008年2月28日 (2008 - 02 - 28) 参见摘要, 权利要求1-29	1-10
A	WO 2015058104 A1 (UNIV UTAH RES FOUND) 2015年4月23日 (2015 - 04 - 23) 参见摘要, 权利要求1-78	1-10
A	CA 2233701 A1 (LLANDER CLAS K等) 1998年2月19日 (1998 - 02 - 19) 参见摘要, 权利要求1-7	1-10
A	US 2012070838 A1 (XI LEI等) 2012年3月22日 (2012 - 03 - 22) 参见摘要, 权利要求1-50	1-10
A	US 2006057596 A1 (KEENER WILLIAM K等) 2006年3月16日 (2006 - 03 - 16) 参见摘要	1-10

☒ 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

2022年7月21日

国际检索报告邮寄日期

2022年8月9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

赵彦豪

电话号码 62411043

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	Sarah Schriek等. "Detection of an L-amino acid dehydrogenase activity in Synechocystis sp. PCC 680" J Exp Bot., 第60卷, 第3期, 2009年2月12日 (2009 - 02 - 12), 第1035-1046页, 参见摘要	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/086204

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	114250281	A	2022年3月29日	无	
WO	2008024052	A1	2008年2月28日	无	
WO	2015058104	A1	2015年4月23日	无	
CA	2233701	A1	1998年2月19日	无	
US	2012070838	A1	2012年3月22日	EP 2606149 A1	2013年6月26日
				US 2019194721 A1	2019年6月27日
				US 2021285026 A1	2021年9月16日
				WO 2012024639 A1	2012年2月23日
US	2006057596	A1	2006年3月16日	无	