

权 利 要 求 书

1、一株鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株，其特征在于，该菌株是鸭疫里默氏杆菌 CH 1AB739_1343，命名为 *Riemerella anatipestifer* CH 1AB739_1343，于 2016 年 8 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心，其保藏号为 CCTCC NO:M2016438，该菌株缺失了血红素转运系统 B739_1343 基因的 2352 bp，所缺失的基因序列如 SEQ ID NO.1 所示。

2、鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法，其特征在于，包括以下步骤：

- 1) PCR 扩增 RA CH 1 B739_1343 基因左右同源臂及 *Spec* 抗性基因；
- 2) 将扩增好的 RA CH 1 B739_1343 基因左右同源臂及 *Spec* 抗性基因进行酶切并连接过夜，构建 B739_1343-LSR 片段；
- 3) 构建重组自杀性质粒 pEX18GMAB739_1343-LSR；
- 4) 构建 RA CH 1 B739_1343 基因缺失株，RA CH 1 B739_1343 基因缺失株即为鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株。

3、根据权利要求 2 所述的鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法，其特征在于，所述的步骤 1) 中 PCR 扩增 RA CH 1 B739_1343 基因左右同源臂及 *Spec* 抗性基因具体为：

1.1) 根据 B739_1343 基因左右同源臂设计两对引物 B739_1343 L F/R 和 B739_1343 R F/R，并在引物 5' 端添加限制性内切酶酶切位点；利用 RA CH 1 基因组作为模板，分别以 B739_1343 L F/R 和 B739_1343 R F/R 为引物扩增 B739_1343 基因左右同源臂片段 B739_1343 L 和 B739_1343 R；PCR 条件为：98℃ 变性 30s，经 98℃ 10s，55℃ 30s，72℃ 30s 循环扩增 30 次，72℃ 延伸 7min；

其中，B739_1343 L F/R 包括 B739_1343 L F 和 B739_1343 L R，B739_1343 L F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，并在引物 5' 端添加限制性内切酶酶切位点为 BamHI；B739_1343 L R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示，并在引物 5' 端添加限制性内切酶酶切位点为 NheI；

B739_1343 R F/R 包括 B739_1343 R F 和 B739_1343 R R，B739_1343 R

~~F的核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示,并在引物 5' 端添加限制性内切酶酶切位点为 EcoRI; B739_1343 R R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示,并在引物 5' 端添加限制性内切酶酶切位点为 KpnI;~~

~~1.2) 根据质粒 pAM238 中的 Spec 抗性基因片段设计引物 Spec F/R,并在引物 5' 端加入 NheI、EcoRI 酶切位点;利用质粒 pAM238 作为模板,以 Spec F/R 为引物 PCR 扩增 Spec 序列;PCR 条件为: 98℃ 变性 30s, 经 98℃ 10s, 55℃ 30s, 72℃ 50s 循环扩增 30 次, 72℃ 延伸 7min;~~

~~其中, Spec F/R 包括 Spec F 和 Spec R, Spec F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示,并在引物 5' 端加入 NheI 酶切位点; Spec R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示,并在引物 5' 端加入 EcoRI 酶切位点。~~

~~4、根据权利要求 3 所述的鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法,其特征在于,所述的步骤 2) 中的构建 B739_1343 LSR 片段具体为:将扩增的左侧同源臂 B739_1343 L 用 BamHI、NheI 进行双酶切,将扩增的右侧同源臂 B739_1343 R 用 EcoRI、KpnI 进行双酶切,将扩增的 Spec 序列用 NheI、EcoRI 进行双酶切;将回收的三个片段 B739_1343 L、Spec、B739_1343 R 连接过夜;然后以连接产物为模,用引物 B739_1343 L F、B739_1343 R R 扩增 B739_1343 LSR 片段。~~

~~5、根据权利要求 4 所述的鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法,其特征在于,所述的步骤 3) 中的构建重组自杀性质粒 pEX18GMA B739_1343 LSR 具体为:将扩增的 B739_1343 LSR 片段和质粒 pEX18GM 用 BamHI 和 KpnI 进行双酶切,将回收的片段和质粒用 T4 连接酶连接过夜,将连接产物转化到大肠杆菌 XL1 Blue 感受态中,涂布于含庆大霉素的 LB 平板进行筛选;将得到的单克隆进行 PCR 鉴定,筛选出含有质粒 pEX18GMA B739_1343 LSR 的阳性克隆;利用质粒小抽试剂盒抽提重组质粒并进行酶切鉴定;将鉴定正确的重组质粒转化到 S17-1 大肠杆菌中。~~

~~6、根据权利要求 5 所述的鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法,其特征在于,所述的步骤 4) 中的构建 RA CH 1 B739_1343 基因缺失株具体为:将大肠杆菌 S17-1 pEX18GMAB739_1343 LSR 接种于 10mL 的 LB 液体培养基中,RA CH 1 划线于含 5% 脱脂羊血的 LB 固体培养基中,37℃ 培养~~

至对数生长期;刮取 RA-CH-1 于 1mL 浓度为 10mmol/mL 的 $MgSO_4$ 溶液中,再用 $MgSO_4$ 溶液洗 2 次;计算供体菌 S17-1-pEX18GMAB739_1343-LSR 达 2.5×10^8 个菌数,受体菌 RA-CH-1 达 10^9 个菌数所需要的体积;根据计算的体积混匀供体菌、受体菌,然后注入滤器中过滤;取下滤膜平铺于血平板上,30°C 5% CO_2 培养 8h;将滤膜上的细菌用 $MgSO_4$ 溶液洗脱下来,涂布于浓度为 50 $\mu g/mL$ 的含卡那霉素和浓度为 80 $\mu g/mL$ 的壮观霉素的血平板上进行培养;挑取生长的单克隆进行 PCR 鉴定,构建得到鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株。

7、根据权利要求 6 所述的鸭疫里默氏杆菌基因缺失弱毒株的构建方法,其特征在于,所述的 PCR 鉴定方法如下:

a) 利用 RA-CH-1 保守序列引物 16s-rRNA-F/R, PCR 扩增 RA-CH-1 的 16s-rRNA 片段,根据电泳结果判定候选突变株是否为 RA-CH-1;若电泳得到的条带与以野生株 CH-1 为模板扩增出的条带大小一致,据此判定该候选突变株为 RA-CH-1,其中,16s-rRNA-F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示;16s-rRNA-R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示;

b) 利用 Spec 抗性基因的引物 Spec-P1/P2,扩增 Spec 抗性基因片段,根据电泳结果判断是否发生基因的替换;若电泳得到的条带与阳性对照大小一致,且以野生株 RA-CH-1 为模板未能扩增出条带,据此判断 Spec 基因已经替换到候选突变株基因组上;Spec-F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示;Spec-R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示;

c) 利用引物 B739_1343-F/R,扩增目的基因,根据电泳结果检测 B739_1343 基因是否被缺失;若以候选突变株 RA-CH-1 Δ B739_1343 为模板未能扩增出条带,以野生株 RA-CH-1 为模板扩增得到的条带,与目的条带预期大小一致,据此判定候选突变株的基因 B739_1343 已被缺失;其中,B739_1343-F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 所示;B739_1343-R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示;

d) 利用引物 SacB-F/R,进行扩增,根据电泳结果检测自杀载体是否被甩出基因组;若以质粒 pEX18GM 为模板扩增得到的条带,与 SacB 基因预期大小一致,而以 RA-CH-1、候选突变株 RA-CH-1 Δ B739_1343 为模板未能

