

## 权 利 要 求 书

1、一种重组鸭瘟病毒，其特征在于，包括鸭瘟病毒全基因组序列，所述鸭瘟病毒全基因组序列内插入了转移载体 ~~pUC18/EGFP TKAB-BAC11~~ 序列，所述转移载体 ~~pUC18/EGFP TKAB-BAC11~~ 序列包括细菌人工染色体核心功能元件(mini-F 序列)、筛选标记绿色荧光蛋白 ~~EGFP~~、Cm 抗性标记和两个 ~~loxP~~ 位点，所述转移载体序列如 SEQ ID NO.1 所示；所述 ~~loxP~~ 位点的核苷酸序列如 SEQ ID NO.24 所示；

所述转移载体 ~~pUC18/EGFP TKAB-BAC11~~ 的插入位点为 ~~DPV CHv TK~~ 基因的 250-251 核苷酸之间，转移载体的左右侧同源臂分别命名为 ~~TKA~~ 和 ~~TKB~~；所述 ~~TKA~~ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.22 所示，所述 ~~TKB~~ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.23 所示；

所述重组鸭瘟病毒以细菌和病毒两种形式保存。

2、一种转移载体构建方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 以质粒 ~~pEGFP ΔMCS~~ 为模板，PCR 扩增 EGFP 表达盒并将其亚克隆至 ~~pUC18~~，获得 ~~pUC18/EGFP~~；

2) 以提取的 ~~DPV DNA~~ 为模板，扩增 ~~TK~~ 基因插入位点左右侧同源臂 ~~TKA~~、~~TKB~~，并逐个亚克隆至 ~~pUC18/EGFP~~，获得 ~~pUC18/EGFP TKAB~~；所述 ~~TKA~~ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.22 所示，所述 ~~TKB~~ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.23 所示；

3) 通过 ~~Sph I~~ 酶切线性化 ~~pBeloBAC11~~ 质粒，并将其与相同酶切处理过的 ~~pUC18/EGFP TKAB~~ 进行连接，~~Amp/Cm~~ 双抗性筛选重组病毒转移载体 ~~pUC18/EGFP TKAB-BAC11~~。

3、一种细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救系统平台的构建方法，其特征在于，将包括细菌人工染色体(BAC)核心功能元件(mini-F)和绿色荧光蛋白(EGFP)的转移载体序列插入到长达 162kb 的鸭瘟病毒中国强毒株(NCBI Accession NO.JQ647509)基因组的 ~~TK~~ 区域，电转化大肠杆菌 ~~DH10B~~ 后获得的阳性克隆提取质粒后转染鸭胚成纤维细胞(~~DEF~~)，拯救出能在宿主细胞 ~~DEF~~ 上产生绿色荧光的细菌人工染色体重组鸭瘟病毒 ~~DEV CHv-BAC G~~；

所述构建方法具体按照以下步骤实施：

1) 通过多步克隆构建包括 ~~TK~~ 基因左右同源臂、EGFP 绿色荧光表达盒、~~pBeloBAC11~~ 核心功能元件三部分组成的重组鸭瘟病毒转移载体 ~~pUC18/EGFP TKAB-BAC11~~；

2) 提取重组鸭瘟病毒转移载体质粒与 DPV DNA 共同转染 DEF 细胞, 筛选能够发出绿色荧光的重组鸭瘟病毒 DPV-CHv-BAC-G;

3) PCR 鉴定重组鸭瘟病毒 DPV-CHv-BAC-G 中 DPV 基因组基因和 BAC 基本功能元件的完整性;

4) 提取环化时期的 DPV-CHv-BAC-G, 电转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, Cm 抗性平板筛选阳性克隆 pBAC-DPV; 其中, 环化时期是指 30-50% 细胞病变时期;

5) 提取 PCR 及酶切图谱鉴定正确的 pBAC-DPV 质粒, 转染 DEF 细胞, 拯救出包括 DPV-CHv 全基因组的感染性克隆;

构建细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救平台所用引物如下:

TKAF: 5' 3', GAATTCATGCTTGCCATCATAACCGTATTCTC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示;

TKAR: 5' 3', TCTAGAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCAC CTCGAGCTTTTCTTTCCTGTG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示;

TKBF: 5' 3', GCATGCACATAGCAACAACCTGACGCAAAAGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示;

TKBR: 5' 3', AAGCTTTCCAGAAAGCTCGCCTAGGTCCTC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示;

EGFPE: 5' 3', TCTAGATAGTTATTAATAGTAATCAATTACG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示;

EGFPR: 5' 3', GTCGACATGCAGTGAAAAAATGCT, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示;

sopBF: 5' 3', ATTCGTTAATTGCGCGCGTAGG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示;

sopBR: 5' 3', GAATATTCAGGCCAGTTATGCT, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示;

repAF: 5' 3', CATGGCGGAAACAGCGGTTATC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示;

~~repAR: 5' 3', ATGTATGAGAGGCGCATTGGAG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示;~~

~~TKF: 5' 3', CGCGGATCCCACTGAATGTCACTGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示;~~

~~TKR: 5' 3', CGCGGATCCCACTGAATGTCACTGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示;~~

~~4、利用权利要求 3 中所述的细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救系统平台构建的重组鸭瘟病毒 UL55 基因缺失株及其回复突变株。~~

~~51、权利要求 3 中所述的一种细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救系统平台在制备鸭瘟病毒疫苗中的应用，其特征在于，包括将其他禽类传染病基因与 DPV CHv-BAC-G 基因组上任意位点的替换或插入，所述其他禽类传染病包括能够引起包括鸡、鸭、鹅在内的雁形目禽类的病毒性传染病；~~

~~所述的细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救系统平台的构建方法如下：将包括细菌人工染色体（BAC）核心功能元件（mini-F）和绿色荧光蛋白（EGFP）的转移载体序列插入到长达 162kb 的鸭瘟病毒中国强毒株（NCBI Accession NO.JQ647509）基因组的 TK 区域，电转化大肠杆菌 DH10B 后获得的阳性克隆提取质粒后转染鸭胚成纤维细胞（DEF），拯救出能在宿主细胞 DEF 上产生绿色荧光的细菌人工染色体重组鸭瘟病毒 DEV CHv-BAC-G；~~

~~所述构建方法具体按照以下步骤实施：~~

~~1) 通过多步克隆构建包括 TK 基因左右同源臂、EGFP 绿色荧光表达盒、pBeloBAC11 核心功能元件三部分组成的重组鸭瘟病毒转移载体 pUC18/EGFP-TKAB-BAC11；~~

~~2) 提取重组鸭瘟病毒转移载体质粒与 DPV DNA 共同转染 DEF 细胞，筛选能够发出绿色荧光的重组鸭瘟病毒 DPV CHv-BAC-G；~~

~~3) PCR 鉴定重组鸭瘟病毒 DPV CHv-BAC-G 中 DPV 基因组基因和 BAC 基本功能元件的完整性；~~

~~4) 提取环化时期的 DPV CHv-BAC-G，电转化至大肠杆菌 DH10B 感受态细胞，Cm 抗性平板筛选阳性克隆 pBAC-DPV；其中，环化时期是指 30-50%细胞病变时期；~~

~~5) 提取 PCR 及酶切图谱鉴定正确的 pBAC-DPV 质粒，转染 DEF 细胞，拯救出包括~~

DPV CHv 全基因组的感染性克隆:

构建细菌人工染色体重组鸭瘟病毒拯救平台所用引物如下:

TKAF: 5'-3', GAATTCATGCTTGCCATCATAACCGTATTCTC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示;

TKAR: 5'-3', TCTAGAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCAC CTCGAGCTTTTCTTTCCTGTG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示;

TKBF: 5'-3', GCATGCACATAGCAACAAGTACGCAAAAGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示;

TKBR: 5'-3', AAGCTTTCCCAGAAAGCTCGCCTAGGTCCTC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示;

EGFPF: 5'-3', TCTAGATAGTTATTAATAGTAATCAATTACG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示;

EGFPR: 5'-3', GTCGACATGCAGTGAAAAAATGCT, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示;

sopBF: 5'-3', ATTCGTTAATTGCGCGCGTAGG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示;

sopBR: 5'-3', GAATATTCAGGCCAGTTATGCT, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示;

repAF: 5'-3', CATGGCGGAAACAGCGGTTATC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示;

repAR: 5'-3', ATGTATGAGAGGCGCATTGGAG, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示;

TKF: 5'-3', CGCGGATCCCACTGAATGTCCTGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示;

TKR: 5'-3', CGCGGATCCCACTGAATGTCCTGC, 核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示。

带格式的: 字体: (中文) 宋体, 小四