

权 利 要 求 书

1、一种微环 DNA 的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 以 MN511A-1 质粒为基础质粒，设计引物，进行 PCR 扩增，在 CMV-EGFP-polyA 阅读框两侧分别引入 lox66 及 lox71 位点，得到扩增产物一，其中所述引物序列分别如 SEQ ID NO:1~4 所示；

其中，引入 lox66 位点的上游引物和下游引物序列分别如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示，引入 lox71 位点的上游引物和下游引物序列分别如 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示，

(2) 用 SacII 和 StuI 同时双酶切所述扩增产物一，连接后，转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，得到 pYL19 完整质粒~~MN511A-1-loxP6671 完整质粒（简称为 pYL19 完整质粒）~~；

(3) 将 pYL19 完整质粒进行 PCR 扩增，并引入 XmaI 和 PacI 酶切位点，得到扩增产物二；其中进行 PCR 扩增的上游引物和下游引物序列分别如 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示；

(4) 将 PGK-cre-polyA 质粒进行 PCR 扩增，并引入 XmaI 和 PacI 酶切位点，得到扩增产物三，所述扩增产物三为含有 PGK 启动子、Cre 重组酶及 PolyA 尾的阅读框；其中进行 PCR 扩增的上游引物和下游引物序列分别如 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示；

(5) 用 XmaI 和 PacI 同时双酶切所述扩增产物二和所述扩增产物三，连接后，转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，得到 pYL46 完整质粒~~pYL19-PGK-cre-polyA 完整质粒（简称为 pYL46 完整质粒）~~；

(6) 对所述 pYL46 完整质粒提取重组质粒，然后将提取的重组质粒瞬时转染至培养状态良好的人胚肾 HEK-293 T 细胞，检测 Cre 重组酶表达及微环 DNA 形成。

权 利 要 求 书

2、根据权利要求1所述的一种微环DNA的制备方法，其特征在于，所述检测Cre重组酶表达的方法具体为：pYL46重组质粒转染HEK-293T细胞24h后，收集细胞蛋白进行Western-Blot检测，并对该细胞进行免疫荧光，检测Cre重组酶表达。

3、根据权利要求1所述的一种微环DNA的制备方法，其特征在于，所述检测微环DNA形成的具体方法为：pYL46重组质粒转染HEK-293T细胞24h后，使用细胞核提取试剂盒提取细胞核，再以酚氯仿法提取细胞核中总DNA，使用PCR的方法检测mcDNA的形成，所采用的上游引物和下游引物序列分别如SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示。

4、一种微环DNA，其特征在于，所述微环DNA通过权利要求1~3任意一项所述方法制备。

5、根据权利要求4所述的一种微环DNA，其特征在于，所述微环DNA含有编码EGFP绿色荧光蛋白报告基因。

6、权利要求4或5所述微环DNA或权利要求1~3任意一项所述微环DNA的制备方法获得的微环DNA在制备抗鸡新城疫病毒细菌制剂中的应用。

~~7、根据权利要求6所述应用，其特征在于，该应用方法包括以下步骤：~~

(1) 用KpnI、NotI同时双酶切pYL46完整质粒；

(2) 目的片段基因VII型NDV的HN基因经NA-HN-KpnI-F/NA-HN-NotI-R引物进行PCR扩增后，也进行KpnI、NotI同时双酶切；

(3) 将pYL46完整质粒的酶切产物与HN基因扩增后的酶切产物以T4连接酶连接，转化Top10后得到pYL47质粒；

(4) 以pYL47质粒转化沙门菌SG9R后免疫3日龄雏鸡。

带格式的：样式 正文缩进d + 首行缩进：2 字符 段前：0.35 行，缩进：首行缩进：0 字符，行距：1.5 倍行距