

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；

(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；

(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；所形成的微环 DNA 含有编码 EGFP 绿色荧光蛋白报告基因；

所述检测 Cre 重组酶表达的方法具体为： pYL46 重组质粒转染 HEK-293 T 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，

权 利 要 求 书

检测 Cre 重组酶表达；

所述检测微环 DNA 形成的具体方法为：pYL46 重组质粒转染 HEK-293 T 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。

~~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-293 T 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-293 T 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。~~

42、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。~~

63、权利要求 4 或 52 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，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

权 利 要 求 书

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。