

(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
2025 年 6 月 26 日 (26.06.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/129367 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/866 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/000125
- (22) 国际申请日: 2023 年 12 月 22 日 (22.12.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 文鹏杰 (WEN, Pengjie); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。王培培 (WANG, Peipei); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。徐富强 (XU, Fuqiang); 中国广东省深圳市南

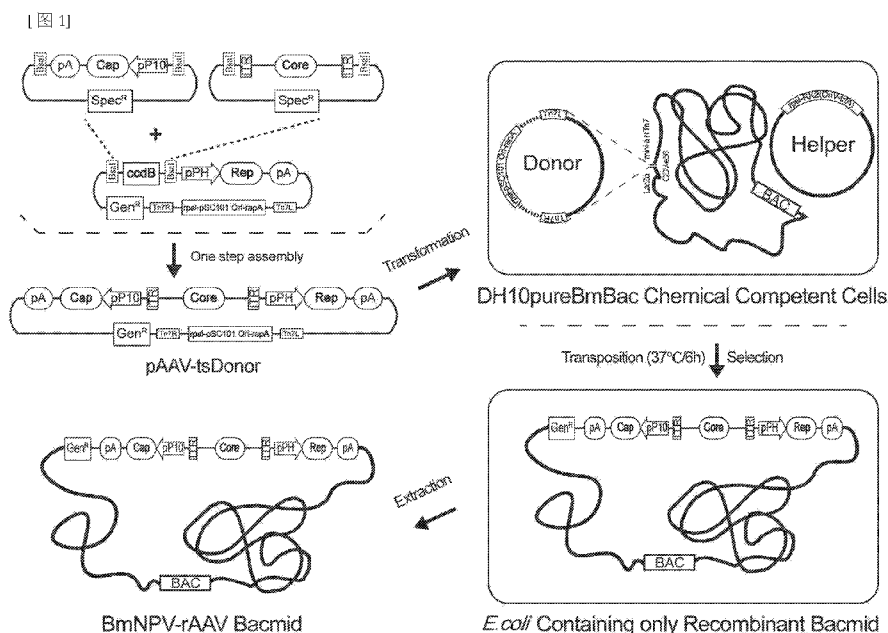
山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。朱续涛 (ZHU, Xutao); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。韩丹 (HAN, Dan); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。朱珍香 (ZHU, Zhenxiang); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905 100123 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,

(54) Title: RECOMBINANT BACMID PREPARATION SYSTEM AND BMNPV-RAAV RECOMBINANT BACMID

(54) 发明名称: 一种重组杆粒制备系统及BmNPV-rAAV重组杆粒



(57) Abstract: Provided are a recombinant bacmid preparation system and a BmNPV-recombinant adeno-associated virus (rAAV) recombinant bacmid. The recombinant bacmid preparation system comprises: a) DH10pureBac competent cells containing a loss-controllable helper plasmid and a modified baculovirus genome, and b) a loss-controllable transfer vector. The BmNPV-rAAV recombinant bacmid is a single BmNPV bacmid containing an rAAV Cap gene expression cassette, a core expression element ITR-GOI, and a Rep gene expression cassette. The present application solves the problem of residual helper plasmids and transfer vectors in a Bac-to-Bac baculovirus expression system and involves a simple technique process.

[见续页]



MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供一种重组杆粒制备系统及BmNPV-rAAV重组杆粒，重组杆粒制备系统包括：a)包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞，b)可控丢失的转移载体。所述BmNPV-rAAV重组杆粒为包含重组腺相关病毒Cap基因表达框、核心表达元件ITR-GOI及Rep基因表达框的单一BmNPV杆粒。解决了Bac-to-Bac杆状病毒表达系统中辅助质粒和转移载体的残留问题，且技术流程简单。

说明书

发明名称: 一种重组杆粒制备系统及BmNPV-rAAV重组杆粒技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种重组杆粒制备系统及BmNPV-rAAV重组杆粒。

背景技术

[0002] 家蚕(*Bombyx mori*)是一种极具中国特色的重要经济昆虫，一生中要经历卵、幼虫、蛹、蛾(成虫)四种形态。虽然至今养蚕的主要目标是获得高产优质的蚕茧为丝绸工业及其衍生产业提供原料，但事实上家蚕幼虫/蛹也是表达外源蛋白的高效生物反应器。自2005年Motohashi等建立基于家蚕的Bac-to-Bac表达系统以来，已有数百种重组蛋白利用家蚕杆状病毒系统成功表达，广泛涉及疫苗生产、医用药物蛋白等领域。

[0003] 家蚕杆状病毒(BmNPV)表达系统与已经商业化的苜蓿银纹夜蛾杆状病毒(AcMNPV)Bac-to-Bac系统的工作原理类似，均是基于Tn7转座子的位点特异性转座来简化和增强产生重组杆粒(Bacmid DNA)，进而快速有效地产生重组杆状病毒。然而受限于Bac-to-Bac系统的固有属性，获取的重组杆粒中普遍残留辅助质粒和转移载体，这不可避免地会影响子一代BEV的拯救。BmNPV表达系统作为具有开发价值的真核表达系统之一至今也未得到进一步发展，仍旧无法获得高纯度重组杆粒。虽然申请人前期开发的基于温度敏感元件的策略(一种重组杆粒及其制备方法，专利申请号：202310643354.7)解决了Bac-to-Bac AcMNPV表达系统中辅助质粒和转移载体的残留问题，但该技术流程繁琐且耗时长(30℃培养12h→48h挑取白色重组子→37℃培养16h→37℃过夜培养挑取单菌落→扩大培养→抽提重组杆粒)，因此不可直接平移至BmNPV表达系统，需要进一步改进。

[0004] 发明内容

[0005] 针对现有技术的以上缺陷，本发明提供了一种重组杆粒制备系统及BmNPV-rAAV重组杆粒，其目的在于，1)分别在辅助质粒和转移载体中引入温度敏感复

制子和反向筛选元件，通过控制温度和反向筛选方式快速获得高纯度重组杆粒——温度敏感型复制子可以控制质粒在宿主中的存在，当温度较低时质粒可以存在宿主中，而温度提高后质粒发生丢失，反向筛选元件可以是链霉素敏感基因rpsL，当存在rpsL元件时DH10B菌株对链霉素敏感，反之该菌株具有链霉素抗性；2)利用Red/ET重组技术将mini-attTn7元件从杆状病毒的基因组的Polh位点移至ODV-E56位点，也可移至任何除了ODV-E56位点之外其他不影响杆状病毒包装的位点，细菌复制调控元件仍置于Polh位置，进一步再敲除非必须基因，从而提高外源蛋白表达量；3)将1)中含有温度敏感复制子和链霉素敏感元件的辅助质粒与2)中改造后的杆状病毒基因组转化MegaX DH10B T1R电转感受态细胞，以制备DH10pureBac感受态细胞，并与1)中制备的转移载体结合使用形成一套无辅助质粒和转移载体残留的新型重组杆粒制备系统，命名为PureBac；4)建立基于家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的PureBac系统，将产生AAV所需的三元件(血清型Cap基因、Rep基因及ITR核心表达元件)同时挂载至该系统的转移载体上，进而获得高纯度BmNPV-rAAV重组杆粒。

[0006] 本发明的具体技术方案如下：

[0007] 本发明提供一种重组杆粒制备系统，所述重组杆粒制备系统包括：a)包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞，b)可控丢失的转移载体；

[0008] 所述包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞的制备方法，包括以下步骤：

[0009] (1)制备可控丢失的辅助质粒：将编码Tn7转座酶的辅助质粒中的起始复制子Ori替换成温度敏感复制子和反向筛选元件，得到可控丢失的辅助质粒；

[0010] (2)改造杆状病毒基因组：从Bac-to-Bac系统中分离出杆状病毒基因组，利用Red/ET重组技术将基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点且细菌复制调控元件仍置于Polh位置，或者将mini-attTn7移至任何除了ODV-E56位点之外其他不影响杆状病毒包装的位点且细菌复制调控元件仍置于Polh位置，得到改造的杆状病毒基因组；

- [0011] (3)将步骤(1)可控丢失的辅助质粒和步骤(2)改造的杆状病毒基因组转化至MegaX DH10B T1^R感受态细胞中,在30℃条件下制备成包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞;
- [0012] 所述可控丢失的转移载体至少包含抗菌素抗性标记、温度敏感复制子、Tn7转座元件及外源蛋白基因表达框。
- [0013] 进一步地,步骤(1)中所述温度敏感复制子选自pSC101或其突变体,或者oriV与trfA基因(235G同义突变)组成的表达框或其突变体;所述温度敏感复制子低温时复制效率较高,随着温度升高复制效率降低甚至被抑制;所述反向筛选元件为反向筛选标记基因;
- [0014] 优选地,所述温度敏感复制子选自oriV与trfA基因(235G同义突变)组成的表达框;
- [0015] 优选地,所述反向筛选元件选自链霉素敏感元件rpsL;
- [0016] 优选地,步骤(1)中所述编码Tn7转座酶的辅助质粒为pMON7124;
- [0017] 优选地,步骤(1)中所述可控丢失的辅助质粒的核苷酸序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示;
- [0018] 优选地,步骤(1)中所述可控丢失的辅助质粒的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- [0019] 进一步地,步骤(2)中所述分离的杆状病毒基因组选自BmNPV或AcMNPV;
- [0020] 优选地,所述改造的杆状病毒基因组还包括敲除杆状病毒基因组的非必须基因;
- [0021] 优选地,所述杆状病毒基因组的非必须基因选自Bm103、Bm104、Bm106、Bm114、Ac29-Ac33、Ac126、Ac127、Ac129、Ac137中的一个或多个;
- [0022] 优选地,所述改造的杆状病毒基因组的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;
- [0023] 优选地,步骤(3)中所述DH10pureBac感受态细胞为化学感受态细胞或电转感受态细胞。
- [0024] 进一步地,可控丢失的转移载体中所述外源蛋白基因表达框的启动子选自Pp10、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互嵌合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子中的一种或几种;

- [0025] 优选地，可控丢失的转移载体中所述温度敏感复制子选自oriV与trfA基因组成的表达框或pSC101元件；
- [0026] 优选地，可控丢失的转移载体中所述温度敏感复制子选自pSC101元件，且所述可控丢失的转移载体同时包含反向筛选元件；值得注意地，所述温度敏感复制子若为pSC101则需要与反向筛选元件结合使用，若为oriV与trfA基因(235G同义突变)可单独使用，与反向筛选元件结合使用效率更高；
- [0027] 优选地，所述反向筛选元件为反向筛选标记基因；
- [0028] 优选地，所述反向筛选元件选自链霉素敏感元件rpsL。
- [0029] 本发明还提供一种重组杆粒制备方法，所述制备方法包括如下步骤：将上述可控丢失的转移载体转化至上述DH10pureBac感受态细胞，经37℃活化，筛选阳性单克隆，即得到无辅助质粒和转移载体残留的高纯度重组杆粒。
- [0030] 本发明还提供一种BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，所述BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统包括：I)所述包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞，其中杆状病毒基因组为家蚕核型多角体病毒基因组；II)所述可控丢失的转移载体，其中可控丢失的转移载体中外源蛋白基因包含AAV的Cap基因、Rep基因及ITR-GOI元件。
- [0031] 进一步地，所述DH10pureBac感受态细胞选自DH10pureBmBac2.1感受态细胞或DH10pureBmBac3.1感受态细胞；
- [0032] 所述DH10pureBmBac2.1感受态细胞中改造的家蚕核型多角体病毒基因组为Bm3.2版本，其家蚕核型多角体病毒基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点，细菌复制调控元件仍置于Polh位置；
- [0033] 所述DH10pureBmBac3.1感受态细胞中改造的家蚕核型多角体病毒基因组为Bm3.3版本，其家蚕核型多角体病毒基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点，细菌复制调控元件仍置于Polh位置，且敲除Bm103、Bm104基因；
- [0034] 优选地，所述Bm3.2的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示。
- [0035] 进一步地，所述AAV的血清型选自AAV1-13及其衍生血清型；
- [0036] 优选地，所述AAV的Cap基因和Rep基因经修饰后分别置于不同的杆状病毒启动子与转录和转录后调控序列之间；

- [0037] 优选地，所述杆状病毒启动子来源于AcMNPV或BmNPV，选自Pp1 0、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互嵌合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子中的一种；
- [0038] 优选地，所述转录和转录后调控序列选自TK polyA或SV40 polyA；
- [0039] 优选地，将ITR-GOI元件、Cap基因表达框、Rep基因表达框分别置于三个质粒上，根据AAV生产需求经一步Golden gate自由组装成可控丢失的转移载体；
- [0040] 优选地，所述ITR-GOI元件置于AAV Cap基因表达框与Rep基因表达框之间；
- [0041] 优选地，所述包含AAV的Cap基因、Rep基因及ITR-GOI元件的可控丢失的转移载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.16所示。
- [0042] 本发明还提供一种BmNPV-rAAV重组杆粒的制备方法，将对应的可控丢失的转移载体转化至对应的DH10pureBac感受态细胞中，经37℃活化，筛选阳性单克隆，即得到无辅助质粒和转移载体残留的高纯度BmNPV-rAAV重组杆粒；
- [0043] 优选地，所述37℃活化时间为6小时。
- [0044] 本发明还提供上述BmNPV-rAAV重组杆粒，所述BmNPV-rAAV重组杆粒为包含重组腺相关病毒Cap基因表达框、核心表达元件ITR-GOI及Rep基因表达框的单一BmNPV杆粒。
- [0045] 与现有技术相比，能够取得以下有益效果：
- [0046] (1)本发明提供的高纯度重组杆粒制备系统，通过从Bac-to-Bac杆状病毒表达系统中分离出杆状病毒基因组，利用Red/ET重组技术将mini-attTn7元件由Polh位点移至ODV-E56位点，也可移至任何除了ODV-E56位点之外其他不影响杆状病毒包装的位点，进一步再敲除杆状病毒非必须基因，并整合在辅助质粒与转移载体分别引入温度敏感复制子和反向筛选元件策略，实现了无辅助质粒和转移载体残留的重组杆粒的简便、快速制备，从而提高了重组杆粒的质量和制备效率
- [0047] (2)本发明提供的BmNPV-rAAV重组杆粒，通过上述“高纯度重组杆粒制备系统”建立了基于家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的PureBac系统，并利用Goldengate组装策略将AAV的血清型Cap基因表达框、Rep基因表达框及ITR-GOI三元件快速负载于BmNPV-PureBac系统的转移载体上，进而转化BmNPV-PureBac系统的

感受态细胞实现了高纯度BmNPV-rAAV重组杆粒制备，为具有中国特色的家蚕幼虫/蛹作为生物反应器开展rAAV载体的大规模、极低成本生产奠定基础。

附图说明

- [0048] 图1是BmNPV-rAAV重组杆粒的制备流程；
- [0049] 图2是实施例1中制备可丢失的辅助质粒并进行丢失性验证；
- [0050] 图3是实施例1中验证制备的辅助质粒在PureBac1.0和PureBac2.0菌株中的丢失情况；
- [0051] 图4是实施例2中制备可丢失的转移载体并进行丢失性验证；
- [0052] 图5是实施例2中验证制备的AAV转移载体转化PureBac感受态细胞发生重组后AAV转移载体和辅助质粒的丢失情况；
- [0053] 图6是实施例3中BmNPV基因组改造示意图；
- [0054] 图7是实施例3中建立家蚕杆状病毒(BmNPV)PureBac系统及拯救重组BEV；
- [0055] 图8是实施例3中验证BmNPV-PureBac系统的兼容性。

具体实施方式

- [0056] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。
- [0057] 实施例1制备可丢失的辅助质粒
- [0058] 辅助质粒pMON7124提供的转座酶可介导外源基因转座到杆状病毒基因组mini-attTn7位点，但在完成转座后辅助质粒仍可在DH10 Bac细菌中复制，这不可避免地造成抽提的重组杆粒中残留pMON7124载体。为此，本申请将辅助质粒中的起始复制子Ori替换成温度敏感复制子和反向筛选元件试图使辅助质粒可控丢失。
- [0059] (1)构建包含温度敏感复制子和反向筛选元件的辅助质粒(Ts&SMs Helper)；
- [0060] 从DH10Bac感受态细胞(赛默飞世尔科技公司，10361012)中分离出pMON7124质粒，并使用高保真PCR酶(Takara，R050A)扩增pMON7124载体以去除Ori起始复制子；通过PCR分别将反向筛选元件rpsL和温度敏感复制子pSC101 Ori-

rapA、OriV-trfA融合并引入同源臂，其中rpsL基因和pSC101 Ori-rapA元件来源于Counter Selection BAC Modification Kit(Gene Bridges, K002)，OriV-trfA元件来源于专利“一种重组杆粒及其制备方法，专利申请号：202310643354.7”；利用Gibson组装技术(NEB公司，E2621L)分别连接上述两个线性DNA片段获得含有rpsL-pSC101 Ori-rapA的辅助质粒(核苷酸序列如SEQ ID NO.1)、rpsL-OriV-trfA的辅助质粒(核苷酸序列如SEQ ID NO.2)，如附图2a所示。

[0061] (2)验证Ts&SMs Helper质粒的丢失情况；

[0062] 将含有Ts&SMs Helper质粒的Stbl3甘油菌分别涂布在四环素抗性的LB固体培养基上，30℃培养过夜，挑选单克隆接种在含有四环素抗性的LB液体培养基中30℃扩大培养，3h后再取200 μL菌液接种在700 μL无抗的LB培养中37℃培养4h试图使细菌中的辅助质粒丢失，之后再取100 μL菌液分别涂布在四环素抗性、链霉素抗性以及四环素/链霉素双抗性的LB固体培养基中37℃培养过夜，如附图2b所示，通过观察细菌在平板上的生长情况、菌落PCR鉴定判断Ts&SMs Helper质粒的丢失情况及能否筛选出丢失Ts&SMs Helper质粒的菌株，如附图2c所示。结果显示，菌液涂布在四环素/链霉素双抗性的LB固体培养基上时无菌落产生，而在四环素抗性和链霉素抗性的LB固体培养基上均可生长；分别挑选四环素抗性平板、链霉素抗性平板中的菌株进行PCR鉴定，观察到链霉素平板来源的菌株中无Ts&SMs Helper质粒信号，而四环素平板来源的菌株则可以检测到，这表明两个Ts&SMs Helper质粒均可丢失而且丢失Ts&SMs Helper质粒的菌株可以被筛选出来。

[0063] 进一步，从DH10Bac(BmNPV)大肠杆菌菌株(上海嘉楚生物工程有限公司，SHBCC D24962)中分离出家蚕核型多角体病毒基因组，并导入MegaX DH10B T1R电转感受态细胞(赛默飞世尔科技公司，C640003)中制备成包含家蚕核型多角体病毒基因组的电转感受态细胞BmDH10B，接着将上述两个含有rpsL-pSC101 Ori-rapA的辅助质粒、rpsL-OriV-trfA的辅助质粒分别导入BmDH10B中制备成PureBac1.0和PureBac2.0电转感受态细胞，如附图3a-b所示，之后通过菌落PCR分别鉴定家蚕核型多角体病毒基因组和Ts&SMs Helper质粒是否存在于PureBac1.0和PureBac2.0电转感受态细胞中，如附图3c, e所示，菌落PCR显示

PureBac1.0和PureBac2.0电转感受态细胞中均包含BmNPV基因组和Ts&SMs Helper质粒。利用附图2b所示的方法验证PureBac1.0和PureBac2.0菌株中Ts&SMs Helper质粒的丢失情况，将PureBac1.0和PureBac2.0菌株在37℃活化4h并分别涂布在含有卡那霉素/链霉素双抗性的LB固体培养基37℃培养过夜，挑选单克隆菌落PCR显示，大多数PureBac1.0菌株中含有rpsL-pSC101 Ori-rapA的辅助质粒可被检测到(附图3d)，而PureBac2.0菌株中只有很少部分含有rpsL-OriV-trfA的辅助质粒被检测到(附图3f)，这表明含有rpsL-OriV-trfA的辅助质粒在37℃的丢失效率要高于含有rpsL-pSC101 Ori-rapA元件的辅助质粒，因此在后续实验中优先选择使用含有rpsL-OriV-trfA的辅助质粒并将37℃活化时间延长至6h，值得注意地：1)利用卡那霉素/四环素双抗性LB固体培养基获取单克隆菌株，2)单克隆株接种在含有卡那霉素/四环素双抗性的LB液体培养基中30℃扩大培养3h，3)取100 μL菌液涂布在含有卡那霉素/链霉素双抗性的LB固体培养基上，4)对菌落中家蚕核型多角体病毒基因组和Ts&SMs Helper质粒分别进行PCR鉴定。

[0064] 实施例2制备可丢失的转移载体

[0065] 在Tn7转座酶作用下，供体质粒(即转移载体)可与杆状病毒穿梭载体发生重组形成一种包含外源基因的表达杆粒，但转化DH10 Bac细菌未发生重组的转移载体仍可复制，这造成抽提的重组杆粒中也残留转移载体。此外，重组腺相关病毒(Recombinant Adeno-associated Virus, rAAV)作为一种高效的基因递送载体已被证实在临床前和临床实验中安全有效，而基于杆状病毒的rAAV生产系统因其具有可扩展性、低成本及可预测的生物安全性而备受关注。综上，这里本发明以包含AAV三元件的转移载体为例将温度敏感复制子和反向筛选元件引入其中展示可控丢失。

[0066] (1)将rpsL-pSC101 Ori-rapA元件负载至AAV-Rep骨架质粒上并进行丢失验证；

[0067] 根据发明专利“一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法及应用”构建含有家蚕核型多角体病毒ph启动子的AAV-Rep骨架质粒T79B00-0-0(pBACKBONE_Bm-AAV-Rep-BsaI-ccdB-Gen，核苷酸序列如SEQ ID NO.3)，考虑到含有pSC101 Ori-rapA元件的温度敏感型质粒

在37℃培养时丢失效率较低而细菌在37℃的生长速度也比30℃快，本发明将 rpsL-pSC101 Ori-rapA元件负载至AAV-Rep骨架质粒T79B00-0-0上构建质粒 tsT79B00-0-0。具体地，利用限制性内切酶AgeI和BspQI双酶切T79B00-0-0获得去除Ori起始复制子的DNA片段，以实施例1中“含有rpsL-pSC101 Ori-rapA的辅助质粒”为模板通过PCR扩增rpsL-pSC101 Ori-rapA基因序列引入同源臂，将两个DNA片段同源重组连接并转化至DB3.1化学感受态细胞中筛选阳性克隆以获得含有rpsL-pSC101 Ori-rapA的AAV-Rep骨架质粒tsT79B00-0-0(pBACKBONE_tsBm-AAV-Rep-BsaI-ccdB-Gen，核苷酸序列如SEQ ID NO.4)，如附图4a所示。

[0068] 利用实施例1中“验证Ts&SMs Helper质粒”的方法验证tsT79B00-0-0质粒的丢失情况，与Ts&SMs Helper质粒不同的是tsT79B00-0-0质粒的抗菌素抗性标记为庆大霉素，因此需要将四环素抗性更换成庆大霉素抗性，如附图4c所示，同样地通过观察细菌在平板上的生长情况、菌落PCR鉴定判断tsT79B00-0-0质粒的丢失情况。结果显示，菌株涂布在庆大霉素/链霉素双抗性的LB固体培养基时无菌落产生，而在庆大霉素抗性和链霉素抗性的LB固体培养基上均可生长；分别挑选庆大霉素抗性平板、链霉素抗性平板中的菌株进行PCR鉴定，观察到链霉素平板来源的菌株中无tsT79B00-0-0质粒信号，而庆大霉素平板来源的菌株则可以检测到(附图4d)，这表明tsT79B00-0-0质粒可丢失而且丢失tsT79B00-0-0质粒的菌株可以被筛选出来。

[0069] (2)制备包含AAV三元件的转移载体(pAAV-tsDonor)进行丢失验证；

[0070] 根据发明专利“一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法及应用”：1)构建含有家蚕核型多角体病毒p10启动子的AAV-Cap骨架质粒9B00(pBACKBONE_Bm-AAV-Cap-BsaI-SmR，核苷酸序列如SEQ ID NO.5)，2)AAV-Core骨架质粒2001来源于该专利，3)将Cap骨架质粒9B00、Core骨架质粒2001与步骤(1)中Rep骨架质粒tsT79B00-0-0组装制备pAAV-tsDonor质粒，如附图4b所示。为了更高效地获取包含AAV三元件的转移载体，取Goldengate组装后的产物5 μl转化stbl3化学感受态细胞分别在30℃和37℃过夜培养，经37℃过夜培养平板上的单菌落远大于在30℃过夜培养的单菌落，挑选37℃

平板、30℃平板中的单克隆菌株进行PCR鉴定，观察到不论单克隆来源于37℃平板还是30℃平板均可鉴定出阳性单克隆(附图4e-f)，并分别各挑选两个阳性克隆菌株扩大培养、提取质粒送测序显示正确，这表明虽然Rep骨架质粒tsT79 B00-0-0中包含温度敏感复制子pSC101 Ori-rapA，但在制备pAAV-tsDonor质粒过程中仍可使用37℃过夜培养条件。

[0071] 进一步，按照步骤(1)中如附图4c所示的方法对上述制备pAAV-tsDonor质粒进行丢失验证，通过观察细菌在平板上的生长情况、菌落PCR鉴定判断pAAV-tsDonor质粒的丢失情况。结果显示，菌株涂布在庆大霉素/链霉素双抗性的LB固体培养基时无菌落产生，而在庆大霉素抗性和链霉素抗性的LB固体培养基上均可生长(附图4g)；分别挑选庆大霉素抗性平板、链霉素抗性平板中的菌株进行PCR鉴定，观察到链霉素平板来源的菌株中无pAAV-tsDonor质粒信号，而庆大霉素平板来源的菌株则可以检测到(附图4h)，这表明pAAV-tsDonor质粒可丢失而且丢失pAAV-tsDonor质粒的菌株可以被筛选出来。

[0072] (3)pAAV-tsDonor质粒转化PureBac感受态细胞发生重组后对pAAV-tsDonor和Ts&SMs Helper质粒进行丢失验证；

[0073] 将步骤(2)制备的pAAV-tsDonor质粒分别转化实施例1中步骤(2)制备的PureBac1.0和PureBac2.0电转感受态细胞，如附图5a所示，37℃活化6h，取100 μL菌液分别涂布在含有卡那霉素/庆大霉素/链霉素/IPTG/X-Gal LB固体培养板上37℃培养过夜，挑选白色菌落进行PCR鉴定，结果显示源于PureBac1.0和PureBac2.0平板的白色菌落均为阳性重组子(附图5b)。接着各挑选两个阳性重组子复涂布于卡那霉素/庆大霉素/链霉素/IPTG/X-Gal LB固体培养板上，经37℃过夜培养后挑选白色菌落分别对BmNPV重组杆粒、pAAV-tsDonor质粒及Ts&SMs Helper质粒进行PCR鉴定，验证pAAV-tsDonor和Ts&SMs Helper质粒的丢失情况，结果显示，来源PureBac1.0平板的单克隆菌落中有1个菌落可检测到pAAV-tsDonor和含有rpsL-pSC101 Ori-rapA元件的辅助质粒信号(附图5c)，而来源PureBac2.0平板的单克隆菌落中仅含有BmNPV重组杆粒(附图5d)，这表明含有pSC101 Ori-rapA元件的pAAV-tsDonor质粒与含有rpsL-OriV-trfA的辅助质粒组合使用可获得无转移载体和辅助质粒残留的高纯度重组杆粒。

[0074] 实施例3改造杆状病毒基因组并建立基于家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的PureBac系统

[0075] 在杆状病毒非必须基因的不同基因座插入外源基因序列时，外源蛋白的表达丰度不尽相同。考虑到1)Gorben P等研究表明，将mini-attTn7移至AcMNPV基因组的ODV-E56(pif-5)位点可介导更高水平的外源蛋白表达且重组BEV在连续传代中更稳定(Gorben P等，2020，Viruses，12，1448)，2)虽然家蚕核型多角体病毒(BmNPV)不同于AcMNPV，但两者的基因组同源性高达90%，综上本发明将mini-attTn7从BmNPV基因组的Polh位点移至ODV-E56位点。

[0076] (1)改造BmNPV基因组；

[0077] 按照“Counter Selection BAC Modification Kit”说明书，将pRedET质粒导入实施例1步骤(2)制备的BmDH10B电转感受态细胞中，制备成含有pRedET质粒和BmNPV基因组的电转感受态细胞Bm3.0/pRedET。1)在氯霉素抗性基因(Cm^R ，源自pBeloBAC11载体，天津庄盟生物科技有限公司，ZK130)两侧通过PCR引入50bp的同源臂(核苷酸序列如SEQ ID NO.6)后转化Bm3.0/pRedET感受态细胞，利用Red/ET重组技术将 Cm^R 插入lef2基因与mini-F ori元件之间如附图6a所示，包含插入 Cm^R 抗性基因的BmNPV基因组(Bm3.1-0)的细菌被制备成电转感受态细胞Bm3.1-0/pRedET；2)在rpsL-Amp^R元件两端通过PCR引入50bp的同源臂(核苷酸序列如SEQ ID NO.7)后转化Bm3.1-0/pRedET感受态细胞，利用Red/ET重组技术替换Bm3.1-0基因组中的LacZ α -Kan^R元件如附图6b所示，完成替换的BmNPV基因组命名为Bm3.1-1，并制备电转感受态细胞Bm3.1-1/pRedET；3)将一段含有rpsL-Amp^R元件两侧同源臂的基因序列(核苷酸序列如SEQ ID NO.8)导入Bm3.1-1/pRedET感受态细胞中敲除rpsL-Amp^R元件如附图6c所示，敲除Bm3.1-1中rpsL-Amp^R元件的BmNPV基因组命名为Bm3.1-2如附图6d所示，制备电转感受态细胞Bm3.1-2/pRedET；4)在rpsL-Kan^R元件两端通过PCR引入50bp的同源臂(核苷酸序列如SEQ ID NO.9)后转化Bm3.1-2/pRedET感受态细胞，利用Red/ET重组技术将rpsL-Kan^R元件插入Bm3.1-2基因组的ODV-e56位点如附图6e所示，Bm3.1-2中ODV-e56位点插入rpsL-Kan^R元件的BmNPV基因组命名为Bm3.1-3，并制备电转感受态细胞Bm3.1-3/pRedET；5)在含有mini-attTn7元件

的LacZ α 基因两端通过PCR引入50bp的同源臂(核苷酸序列如SEQ ID NO.10)后转化Bm3.1-3/pRedET感受态细胞, 利用Red/ET重组技术替换Bm3.1-3基因组中的rpsL-Kan^R元件如附图6f所示, 完成Bm3.1-3中rpsL-Kan^R元件替换的BmNPV基因组命名为Bm3.2如附图6g所示, 对Bm3.2进行全基因组测序(核苷酸序列如SEQ ID NO.11, 生工生物工程(上海)股份有限公司), 并且包含Bm3.2基因组的细菌被制备成电转感受态细胞Bm3.2, 进一步将pRedET质粒导入Bm3.2感受态细胞中制备成电转感受态细胞Bm3.2/pRedET。

[0078] (2)建立家蚕杆状病毒(BmNPV)PureBac系统;

[0079] 由实施例1可知与rpsL-pSC101 Ori-rapA元件相比, 含有rpsL-OriV-trfA元件的辅助质粒丢失效果最佳, 因此本发明将含有rpsL-OriV-trfA元件的辅助质粒导入步骤(1)制备的Bm3.2感受态细胞中, 制备成化学感受态细胞DH10pureBmBac2.1(简称pureBmBac2.1)如附图7a所示。

[0080] 实施例2中构建了AAV Rep(tsT79B00-0-0)和Cap(9B00)骨架质粒, 根据发明专利“一种杆状病毒-rAAV生产系统中转移载体pAAV-Donor的制备方法及应用”, 1)经修饰的AAV2-Rep基因表达框插入tsT79B00-0-0获得AAV-Rep质粒tsT79B00-0-4(核苷酸序列如SEQ ID NO.12), 2)修饰后的AAV2和AAV9 Cap基因表达框分别插入9B00获得AAV-Cap质粒9B02和9B09(核苷酸序列如SEQ ID NO.13和SEQ ID NO.14); 3)使用该专利中的AAV-Core质粒2006。组装tsT79B00-0-4+9B02+2006形成tsT79B02-2006-4(核苷酸序列如SEQ ID NO.15)、tsT79B00-0-4+9B09+2006形成tsT79B09-2006-4(核苷酸序列如SEQ ID NO.16)即pAAV-tsDonor。

[0081] 将上述两个pAAV-tsDonor质粒分别转化pureBmBac2.1化学感受态细胞如附图7b所示, 在37℃经6h转座后涂布在含有庆大霉素/链霉素/IPTG/X-Gal LB固体培养板上37℃培养过夜, 之后挑选白色菌落在庆大霉素/链霉素/IPTG/X-Gal LB固体培养板上划线并37℃过夜培养, 菌落PCR鉴定出仅含有BmNPV-rAAV重组杆粒的菌株如附图7c所示。提取BmNPV-rAAV重组杆粒并转染至BmN细胞(ATCC, CRL-8910), 结果显示, 在转染第4天时绿色荧光最强, 其中转染穿梭载体Bm3.2-rAAV2-CMV-eGFP-hGH的荧光强度高于Bm3.2-rAAV9-CMV-

eGFP-hGH(附图7d), 进一步取转染BmNPV-rAAV重组杆粒的BmN细胞上清液加入到新培养的BmN细胞中, 4天后荧光显微镜进行观察, 检测到BmN细胞被绿色荧光点亮, 这表明BmNPV-rAAV重组杆粒转染BmN细胞可以拯救出重组BEV如附图7d-e所示。

[0082] (3)验证BmNPV-PureBac系统的兼容性;

[0083] 步骤(1)中制备了Bm3.2/pRedET电转感受态细胞, 在 $rpsL-Amp^R$ 元件两端通过PCR引入50bp的同源臂(核苷酸序列如SEQ ID NO.17)后转化Bm3.2/pRedET感受态细胞, 利用Red/ET重组技术替换Bm3.2基因组中的部分Bm103和Bm104基因序列如附图8a所示, 完成替换的BmNPV基因组命名为Bm3.3-0, 并制备电转感受态细胞Bm3.3-0/pRedET; 进一步, 将一段含有 $rpsL-Amp^R$ 元件两侧同源臂的基因序列(核苷酸序列如SEQ ID NO.18)导入Bm3.3-0/pRedET感受态细胞中敲除 $rpsL-Amp^R$ 元件如附图8b所示, 敲除Bm3.3-0中 $rpsL-Amp^R$ 元件的BmNPV基因组命名为Bm3.3如附图8c所示, 包含Bm3.3基因组的细菌被制备成电转感受态细胞Bm3.3。

[0084] 含有 $rpsL-OriV-trfA$ 元件的辅助质粒导入制备的Bm3.3感受态细胞中, 制备成化学感受态细胞DH10pureBmBac3.1(简称pureBmBac3.1)如附图8d所示。将发明专利“一种重组杆粒及其制备方法, 专利申请号: 202310643354.7”制备的 $pFD^{RK2-ts}-Cap-ITR(GOI)-Rep$ 质粒分别转化pureBmBac2.1和pureBmBac3.1感受态细胞如附图8e所示, 37°C经6h转座后涂布在含有氯霉素/庆大霉素/链霉素/IPTG/X-Gal LB固体培养板上37°C培养过夜, 观察到清晰可见的白色单克隆菌落如附图8f所示, 挑选白色菌落分别对BmNPV重组杆粒、 $pFD^{RK2-ts}-Cap-ITR(GOI)-Rep$ 和Ts&SMs Helper质粒中共有的 $OriV-trfA$ 元件进行PCR鉴定, 如附图8g所示。结果显示, pureBmBac2.1平板来源的1个菌株中有Bm3.2重组杆粒信号、无AAV转移质粒和辅助质粒信号, 而pureBmBac3.1平板来源的菌株有3个阳性克隆, 进一步抽提重组杆粒并通过PCR插入的AAV Cap基因表达框、核心表达元件ITR-GOI及Rep基因表达框送测序显示结果正确, 这表明建立的基于家蚕核型多角体病毒的BmNPV-PureBac系统具有兼容性。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种重组杆粒制备系统，其特征在于，所述重组杆粒制备系统包括：a)包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞，b)可控丢失的转移载体；所述包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞的制备方法，包括以下步骤：
- (1)制备可控丢失的辅助质粒：将编码Tn7转座酶的辅助质粒中的起始复制子Ori替换成温度敏感复制子和反向筛选元件，得到可控丢失的辅助质粒；
- (2)改造杆状病毒基因组：从Bac-to-Bac系统中分离出杆状病毒基因组，利用Red/ET重组技术将基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点且细菌复制调控元件仍置于Polh位置，或者将mini-attTn7移至任何除了ODV-E56位点之外其他不影响杆状病毒包装的位点且细菌复制调控元件仍置于Polh位置，得到改造的杆状病毒基因组；
- (3)将步骤(1)可控丢失的辅助质粒和步骤(2)改造的杆状病毒基因组转化至MegaX DH10B T1^R感受态细胞中，在30℃条件下制备成包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞；
- 所述可控丢失的转移载体至少包含抗菌素抗性标记、温度敏感复制子、Tn7转座元件及外源蛋白基因表达框。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(1)中所述温度敏感复制子选自pSC101或其突变体，或者oriV与trfA基因组成的表达框或其突变体；所述反向筛选元件为反向筛选标记基因。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(1)中所述温度敏感复制子选自oriV与trfA基因组成的表达框；所述反向筛选元件选自链霉素敏感元件rpsL；

- [权利要求 4] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(1)中所述编码Tn7转座酶的辅助质粒为pMON7124。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(1)中所述可控丢失的辅助质粒的核苷酸序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示。
- [权利要求 6] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(2)中所述分离的杆状病毒基因组选自BmNPV或AcMNPV。
- [权利要求 7] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，所述改造的杆状病毒基因组还包括敲除杆状病毒基因组的非必须基因。
- [权利要求 8] 如权利要求7所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，所述杆状病毒基因组的非必须基因选自Bm103、Bm104、Bm106、Bm114、Ac29-Ac33、Ac126、Ac127、Ac129、Ac137中的一个或多个。
- [权利要求 9] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，所述改造的杆状病毒基因组的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示。
- [权利要求 10] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，步骤(3)中所述DH10pureBac感受态细胞为化学感受态细胞或电转感受态细胞。
- [权利要求 11] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，可控丢失的转移载体中所述外源蛋白基因表达框的启动子选自Pp10、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互嵌合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子中的一种或几种；
可控丢失的转移载体中所述温度敏感复制子选自oriV与trfA基因组成的表达框或pSC101元件；
所述反向筛选元件为反向筛选标记基因。
- [权利要求 12] 如权利要求1所述的重组杆粒制备系统，其特征在于，可控丢失的转移载体中所述温度敏感复制子选自pSC101元件，且所述可控丢失的转移载体同时包含反向筛选元件；
所述反向筛选元件选自链霉素敏感元件rpsL。

- [权利要求 13] 一种重组杆粒制备方法，其特征在于，所述制备方法包括如下步骤：将权利要求1所述可控丢失的转移载体转化至权利要求1所述DH10pureBac感受态细胞，经37℃活化，筛选阳性单克隆，即得到无辅助质粒和转移载体残留的高纯度重组杆粒。
- [权利要求 14] 一种BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统包括：I)权利要求1所述包含可控丢失的辅助质粒和改造的杆状病毒基因组的DH10pureBac感受态细胞，其中杆状病毒基因组为家蚕核型多角体病毒基因组；II)权利要求1所述可控丢失的转移载体，其中可控丢失的转移载体中外源蛋白基因包含AAV的Cap基因、Rep基因及ITR-GOI元件。
- [权利要求 15] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述DH10pureBac感受态细胞选自DH10pureBmBac2.1感受态细胞或DH10pureBmBac3.1感受态细胞；
所述DH10pureBmBac2.1感受态细胞中改造的家蚕核型多角体病毒基因组为Bm3.2版本，其家蚕核型多角体病毒基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点，细菌复制调控元件仍置于Polh位置；
所述DH10pureBmBac3.1感受态细胞中改造的家蚕核型多角体病毒基因组为Bm3.3版本，其家蚕核型多角体病毒基因组中mini-attTn7从Polh位点移至ODV-E56位点，细菌复制调控元件仍置于Polh位置，且敲除Bm103、Bm104基因。
- [权利要求 16] 如权利要求15所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述Bm3.2的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示。
- [权利要求 17] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述AAV的血清型选自AAV1-13及其衍生血清型。
- [权利要求 18] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述AAV的Cap基因和Rep基因经修饰后分别置于不同的杆状病毒启动子与转录和转录后调控序列之间；

所述杆状病毒启动子来源于AcMNPV或BmNPV，选自Pp10、Pph、Pp6.9、Pgp64、Pie-1及其相互嵌合或启动子前添加增强子形成的组成型启动子中的一种或几种；

所述转录和转录后调控序列选自TK polyA或SV40 polyA。

[权利要求 19] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，将ITR-GOI元件、Cap基因表达框、Rep基因表达框分别置于三个质粒上，根据AAV生产需求经一步Golden gate自由组装成可控丢失的转移载体。

[权利要求 20] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述ITR-GOI元件置于AAV Cap基因表达框与Rep基因表达框之间。

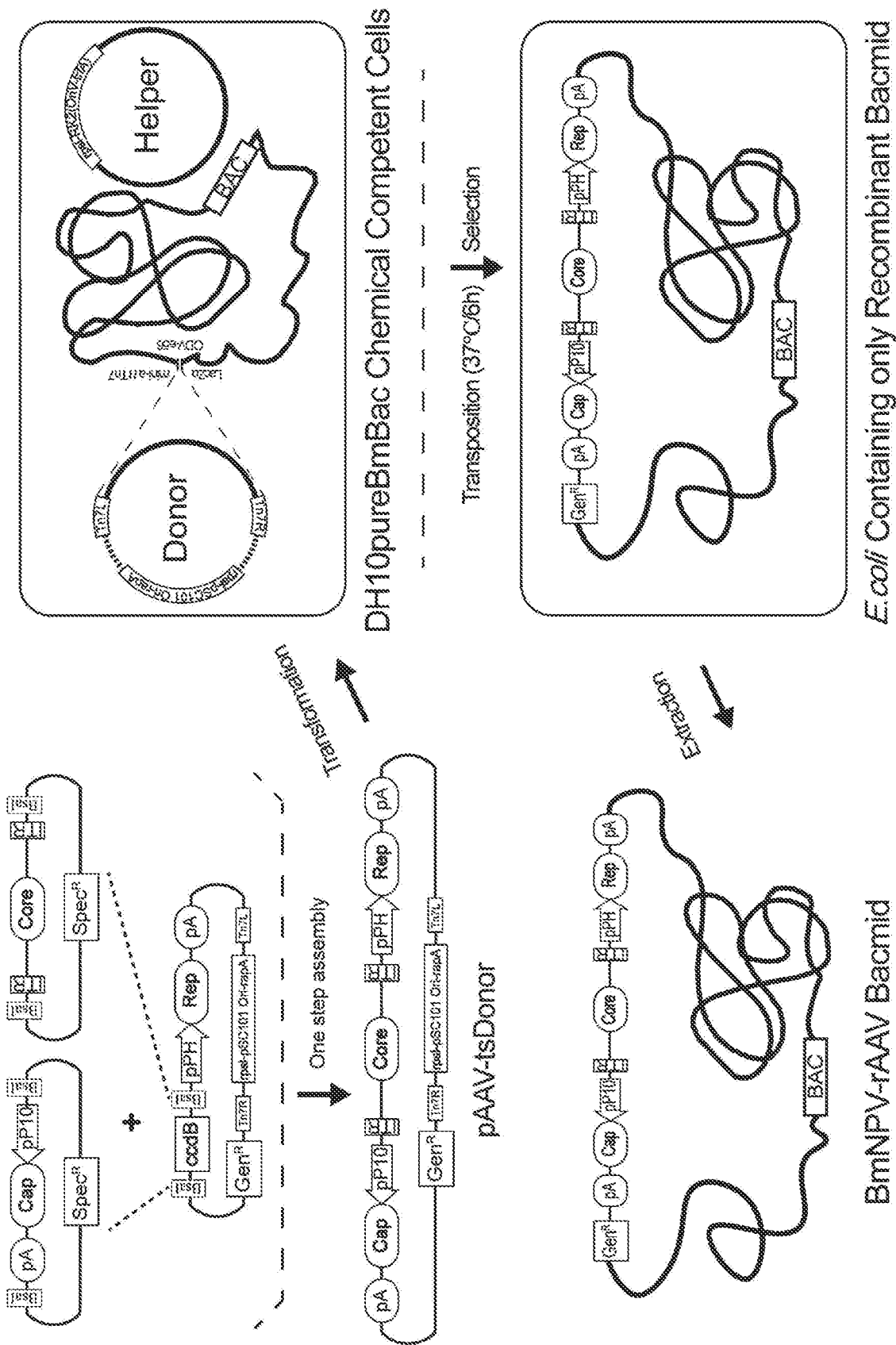
[权利要求 21] 如权利要求14所述的BmNPV-rAAV重组杆粒制备系统，其特征在于，所述包含AAV的Cap基因、Rep基因及ITR-GOI元件的可控丢失的转移载体的核苷酸序列如SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.16所示。

[权利要求 22] 一种BmNPV-rAAV重组杆粒的制备方法，其特征在于，将权利要求14所述可控丢失的转移载体转化至权利要求14所述DH10pureBac感受态细胞中，经37℃活化，筛选阳性单克隆，即得到无辅助质粒和转移载体残留的高纯度BmNPV-rAAV重组杆粒；

[权利要求 23] 如权利要求22所述的制备方法，其特征在于，所述37℃活化时间为6小时。

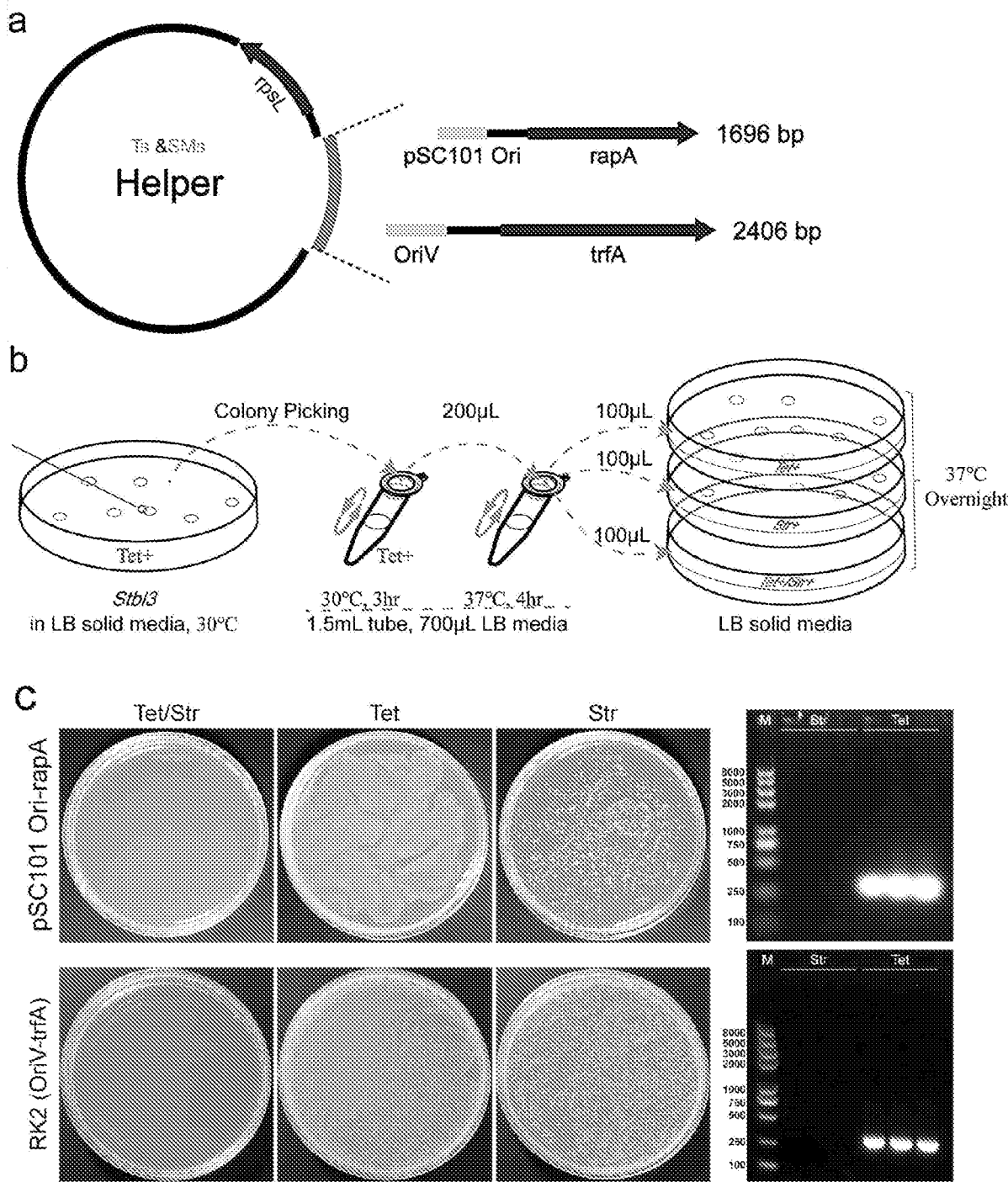
[权利要求 24] 权利要求22所述制备方法制备得到的BmNPV-rAAV重组杆粒，其特征在于，所述BmNPV-rAAV重组杆粒为包含重组腺相关病毒Cap基因表达框、核心表达元件ITR-GOI及Rep基因表达框的单一BmNPV杆粒。

[图 1]



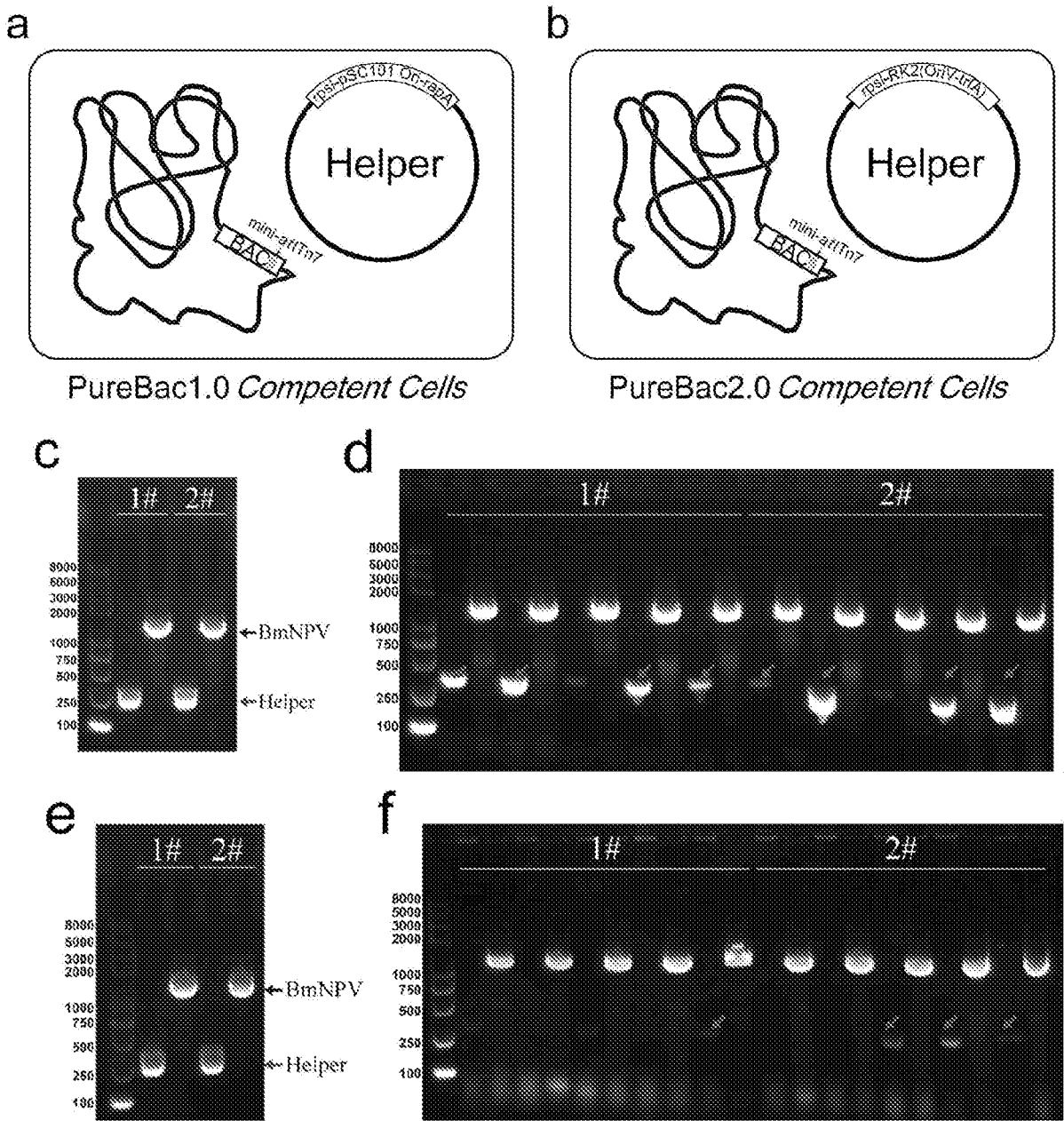
[图 2]

细则 26,
28.03.2024

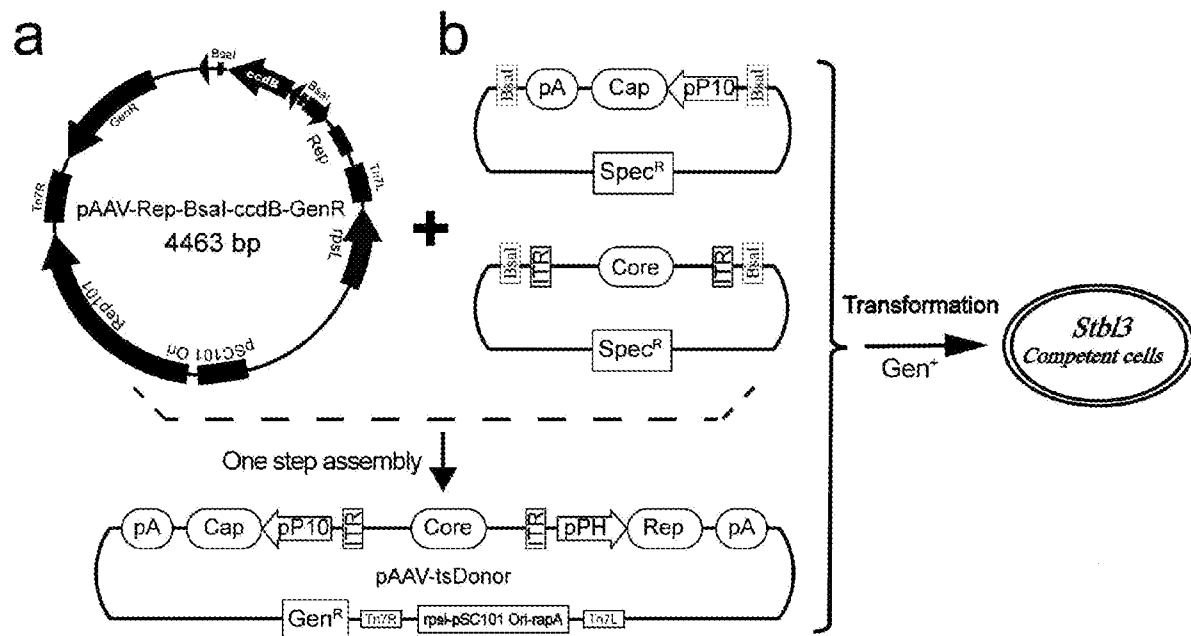


[图 3]

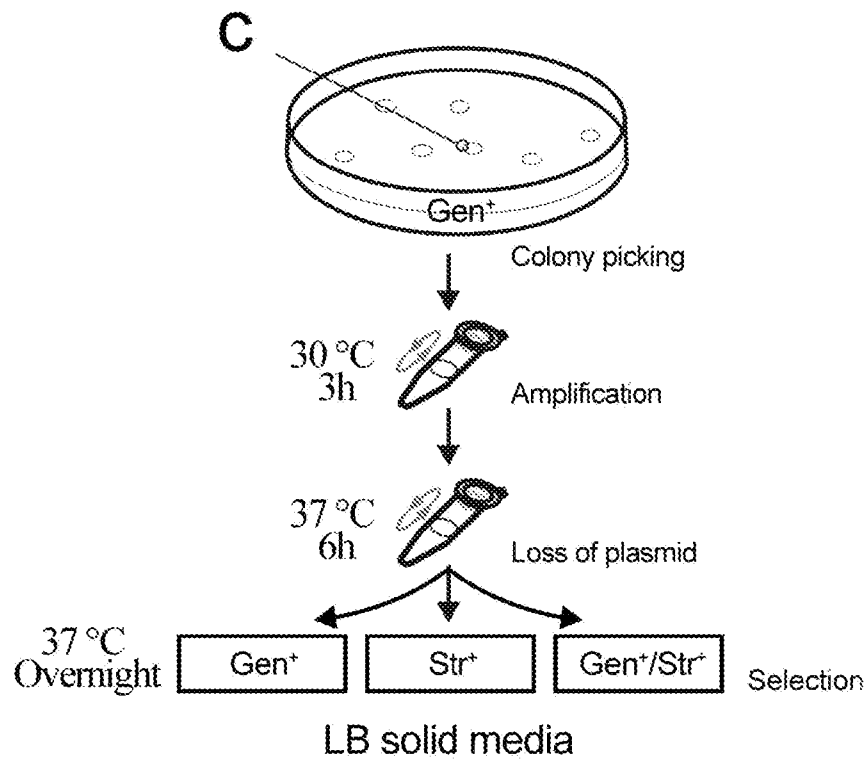
细则 26,
28.03.2024



[図 4a-b]



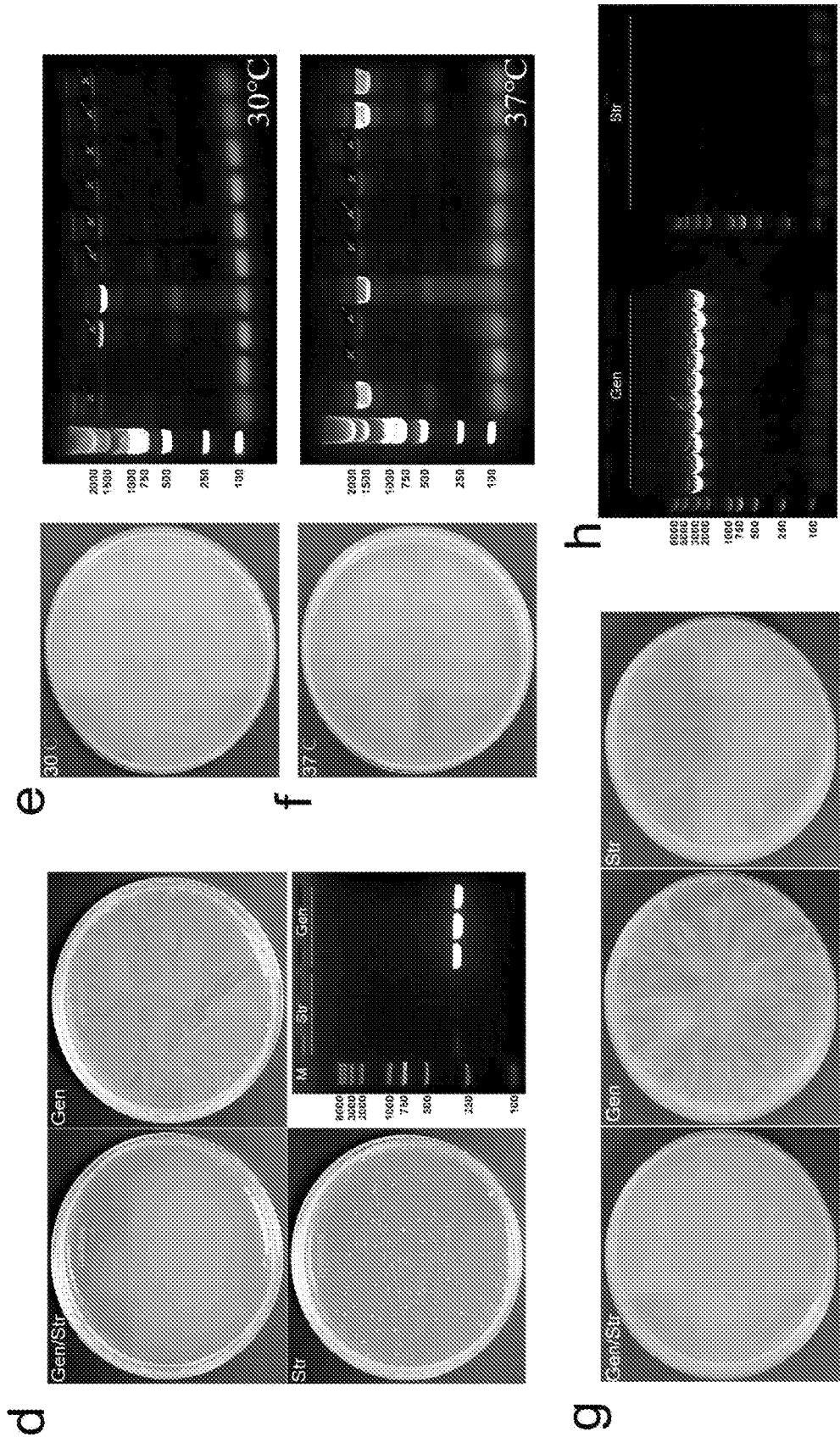
[图 4c]



细则 26,
28.03.2024

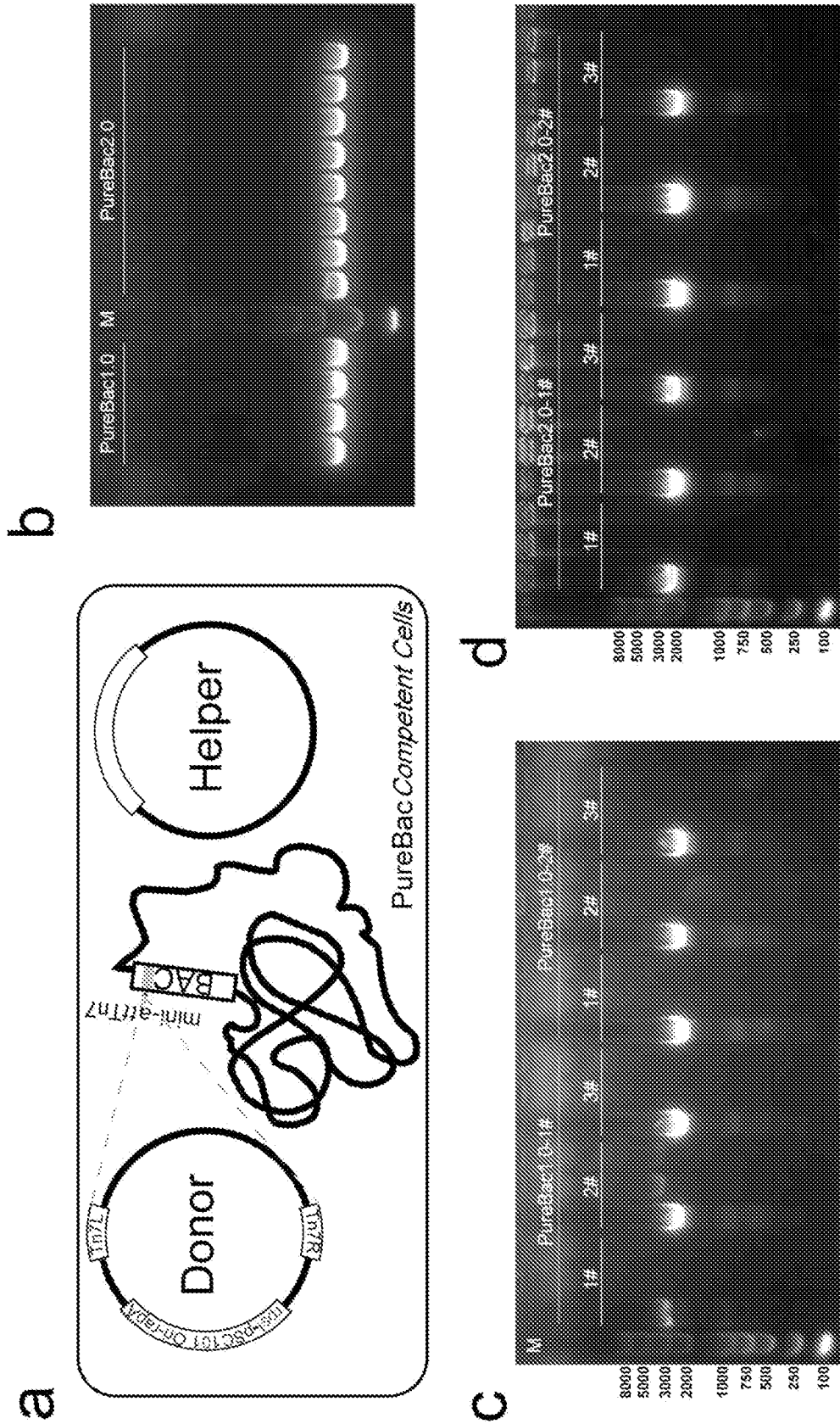
细则 26,
28.03.2024

[图 4d-h]

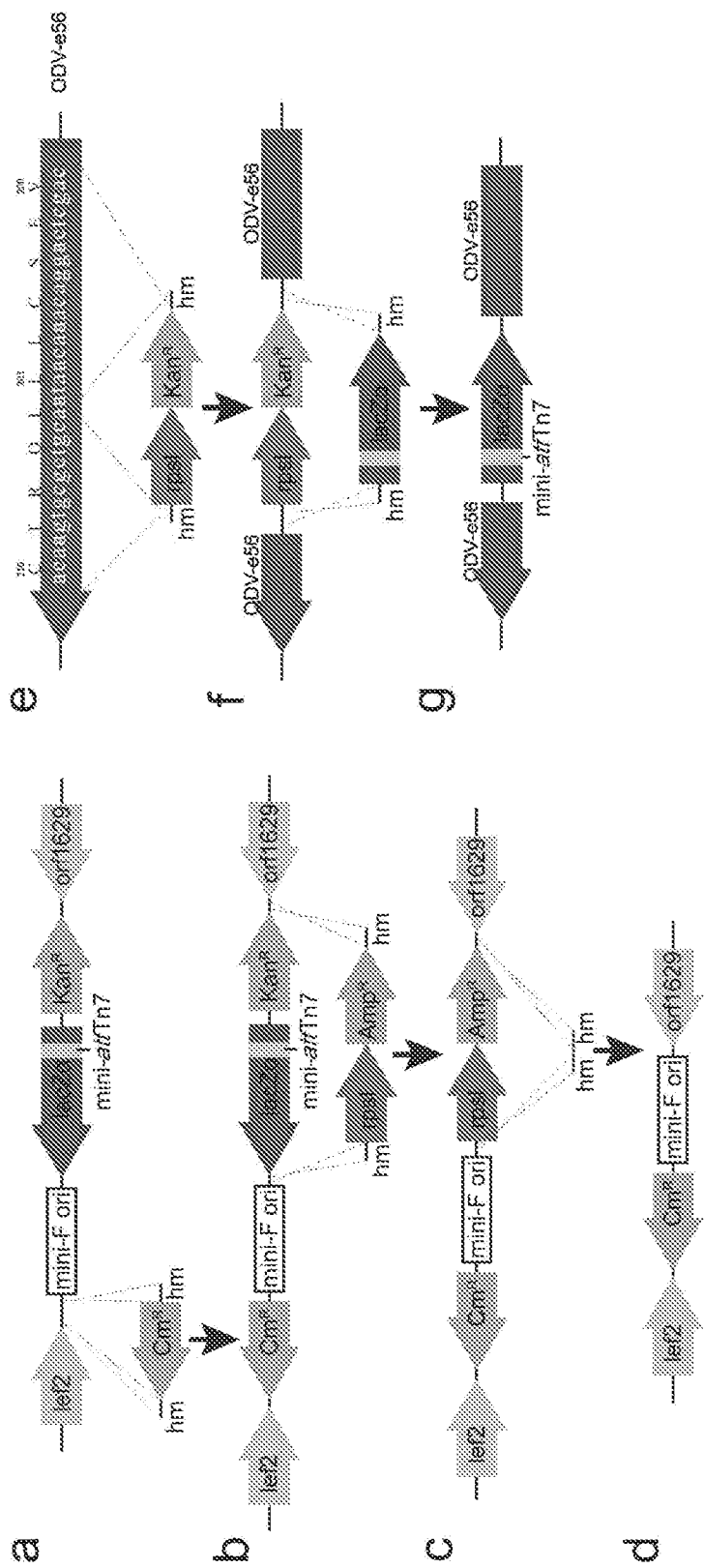


细则 26,
28.03.2024

[图 5]

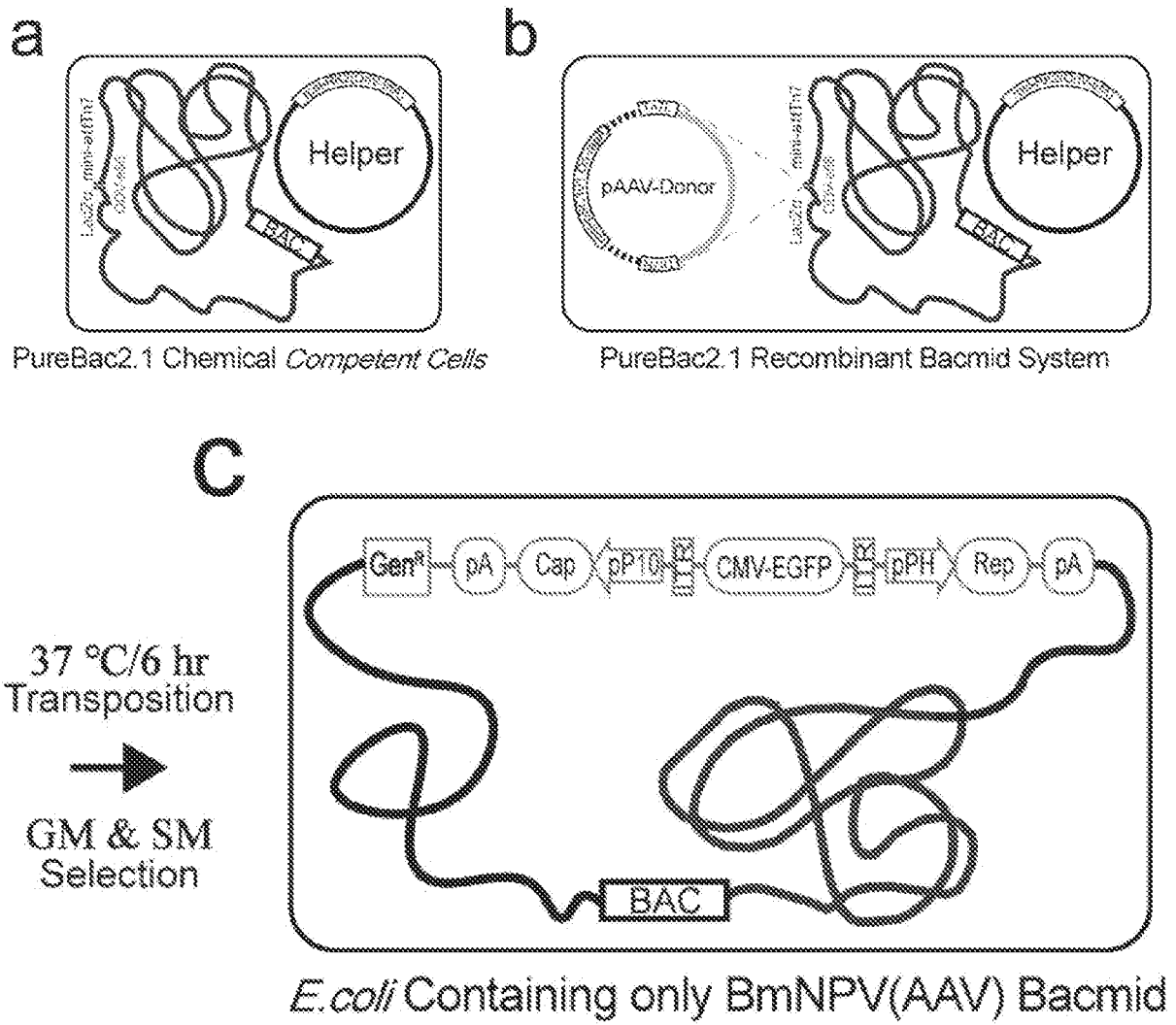


[图 6]



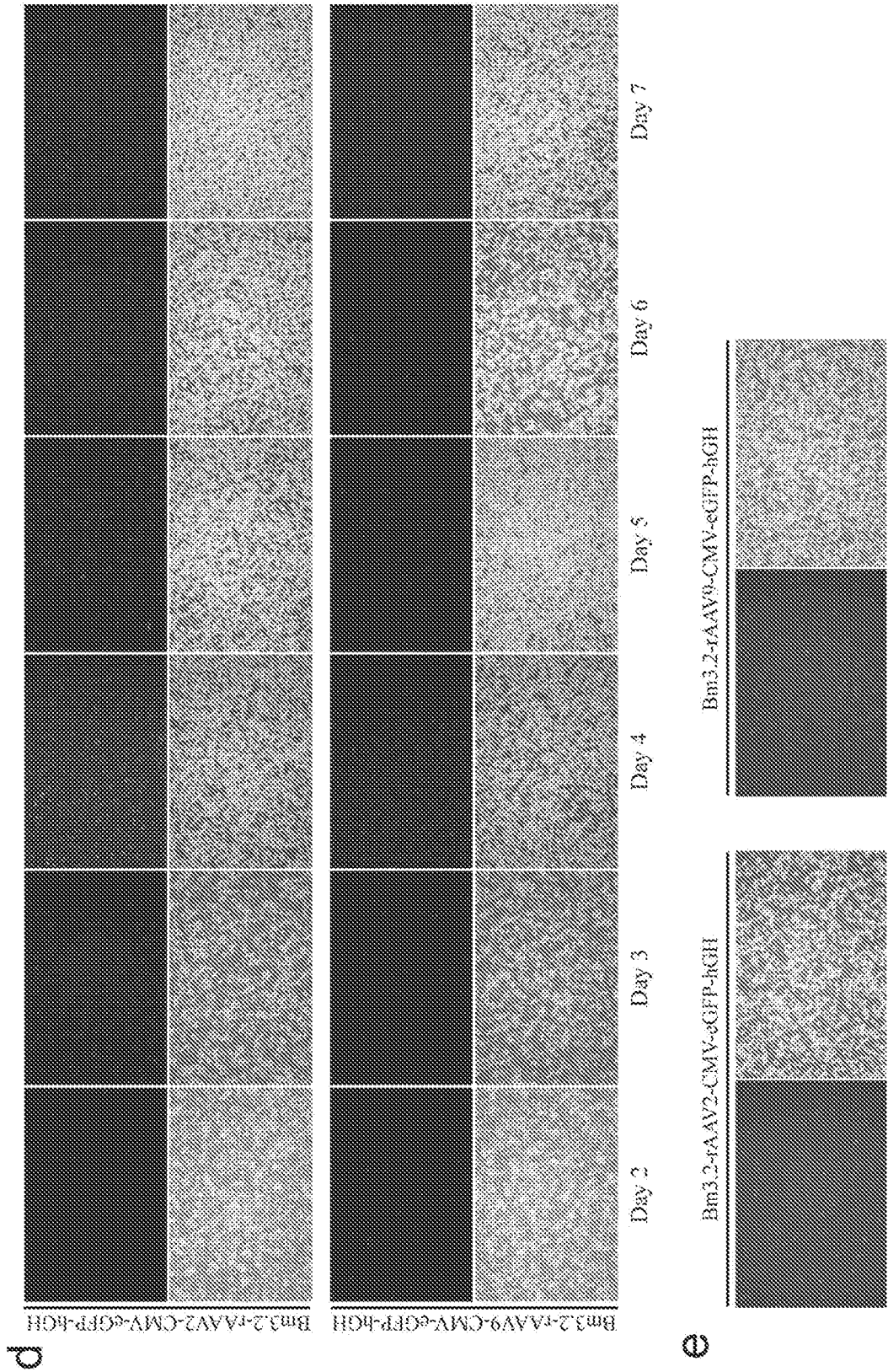
细则 26,
28.03.2024

[图 7a-c]

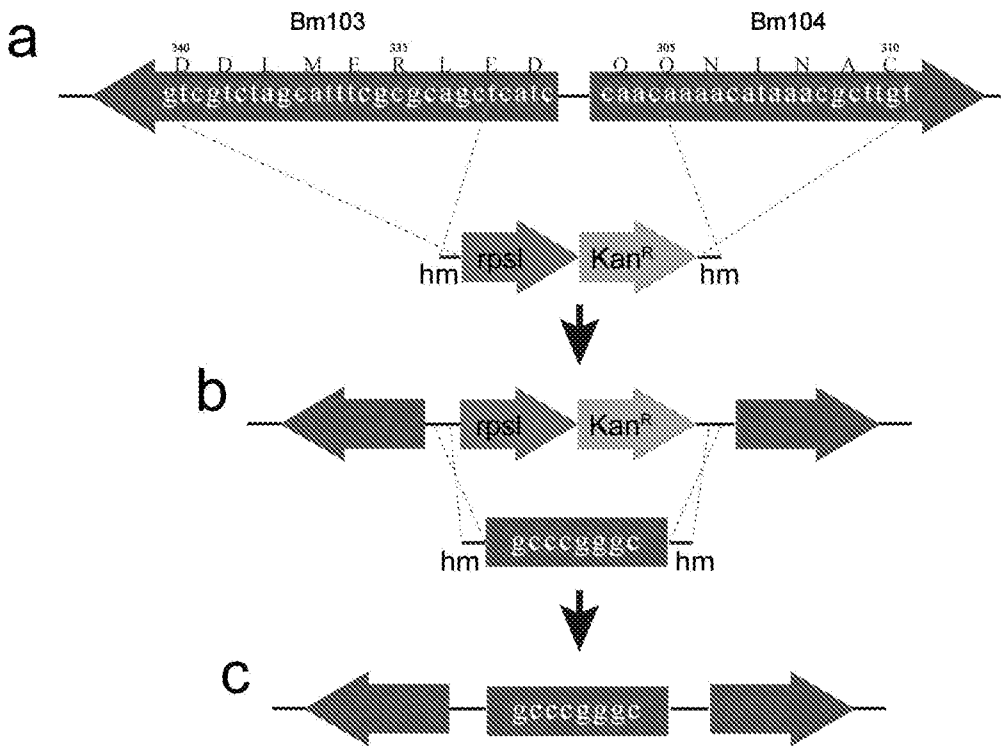
细则 26,
28.03.2024

[图 7d-e]

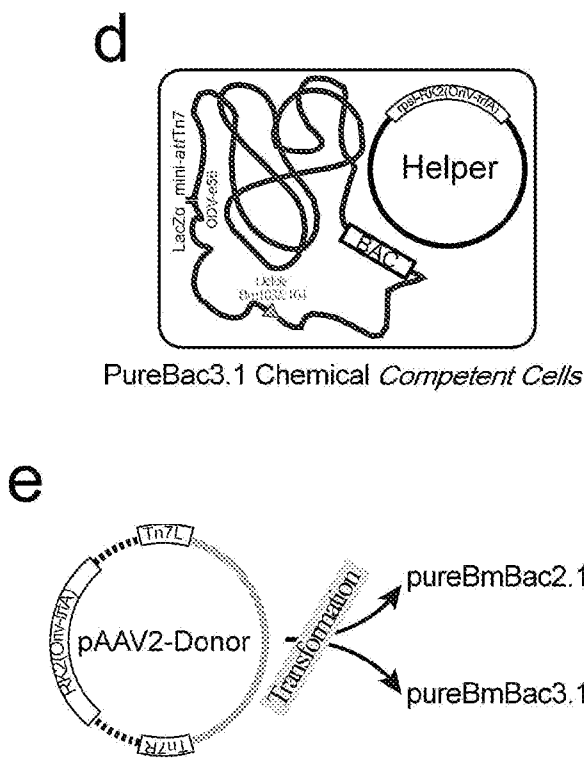
细则 26,
28.03.2024



[图 8a-c]



[图 8d-e]

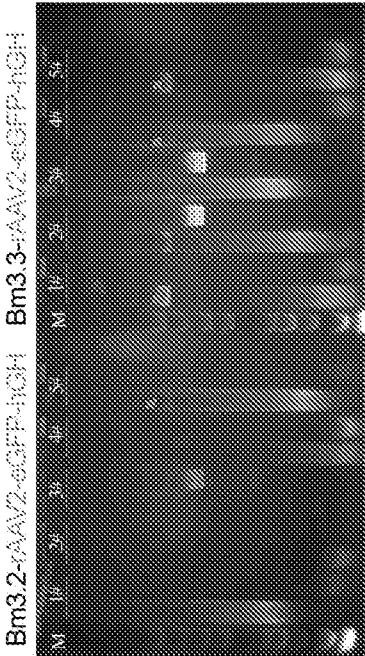


细则 26,
28.03.2024

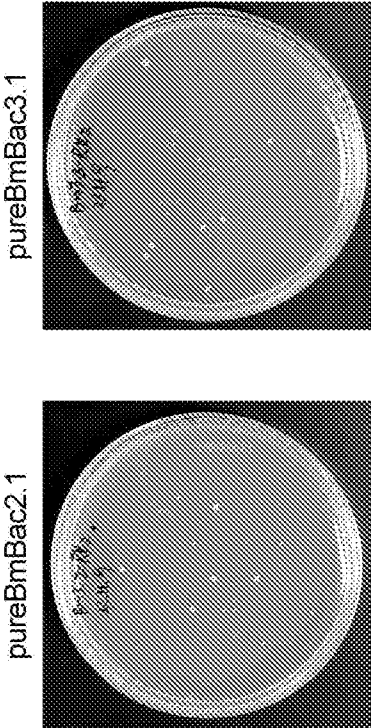
细则 26,
28.03.2024

[图 8f-g]

g



f



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/000125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/866(2006.01)i; C12N15/09(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) IPC:C12N 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) CJFD, DWPI; CNABS; CNTXT; CNKI; WOTXT; USTXT; EPTXT; ENTXTC; ENTXT; 万方, WANFANG; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; BING; Pubmed; ISI web of knowledge; Elsevier Science Direct; Springerlink; NCBI; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; STN: 重组杆粒, bacmid, DH10, helper, donor, transfer, plasmid, vector, 反向, 温度敏感, attTn7, ODV-E56, Polh, oriV, trfA, rpsL, pMON7124, SEQ ID NOs.1-2, 11, 15-16, 申请人, 发明人, NPV		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG, Zhihong et al. "Introduction of Temperature-sensitive Helper and Donor Plasmids into Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems" <i>Virologica Sinica</i> , Vol. 30, No. 5, 19 October 2015 (2015-10-19), 379-385 abstract, results, and figure 1	1-24
Y	PIJLMAN, G. P. et al. "Relocation of the attTn7 Transgene Insertion Site in Bacmid DNA Enhances Baculovirus Genome Stability and Recombinant Protein Expression in Insect Cells" <i>Viruses</i> , Vol. 12, 16 December 2020 (2020-12-16), 1-17 abstract, material method, and figure 1	1-24
Y	刘金泽等 (LIU, Jinze et al.). "一种用于Red同源重组的正反筛选表达盒的构建及其反向筛选性能分析 (Establishment and Performance Analysis of a Counter-selection Cassette for Red Recombination)" <i>中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)</i> , Vol. 40, No. 10, 31 October 2018 (2018-10-31), 902-907 abstract	1-24
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 02 September 2024		Date of mailing of the international search report 09 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/000125

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020133772 A1 (WUHAN INSTITUTE OF PHYSICS AND MATHEMATICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 02 July 2020 (2020-07-02) claims 1-10, and embodiment 1	1-24
A	CN 101724652 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 09 June 2010 (2010-06-09) claim 1	1-24
A	CN 1544625 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 10 November 2004 (2004-11-10) claim 1	1-24
A	LIU, Xingjian et al. "A Highly Efficient and Simple Construction Strategy for Producing Recombinant Baculovirus Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus" <i>PLoS One</i> , Vol. 11, No. 3, 23 March 2016 (2016-03-23), e0152140, 1-17 materials and methods	1-24
A	WESTENBERG, M. et al. "Escherichia coli MW005: Lambda Red-mediated Recombineering and Copy-number Induction of OriV-equipped Constructs in a Single Host" <i>BMC Biotechnology</i> , Vol. 10, 29 March 2010 (2010-03-29), figure 1	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/000125

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/000125

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020133772	A1	02 July 2020	JP	2021513326	A	27 May 2021
				JP	7134240	B2	09 September 2022
				CA	3123692	A1	02 July 2020
				EP	3693466	A4	12 August 2020
				EP	3693466	A1	19 October 2022
				KR	20210095926	A	03 August 2021
CN	101724652	A	09 June 2010	None			
CN	1544625	A	10 November 2004	None			

A. 主题的分类

C12N 15/866(2006.01)i; C12N15/09(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)

IPC:C12N

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))

CJFD,DWPI,CNABS,CNXTX;CNKI;WOTXT;USTXT;EPTXT;ENTXTC;ENTXT;万方;百度学术;BING;Pubmed;ISI web of knowledge;Elsevier Science Direct;Springerlink;NCBI;中国专利生物序列检索系统;STN:重组杆粒, bacmid, DH10, helper, donor, transfer, plasmid, vector,反向, 温度敏感, attTn7, ODV-E56, Polh, oriV, trfA, rpsL,pMON7124,SEQ ID NOs.1-2,11,15-16,申请人, 发明人, NPV

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
Y	HUANG,Z.H.等. "Introduction of temperature-sensitive helper and donor plasmids into Bac-to-Bac baculovirus expression systems" VIROLOGICA SINICA, 第30卷, 第5期, 2015年10月19日 (2015 - 10 - 19), 379-385 摘要、结果、图1	1-24
Y	PIJLMAN,G.P.等. "Relocation of the attTn7 Transgene Insertion Site in Bacmid DNA Enhances Baculovirus Genome Stability and Recombinant Protein Expression in Insect Cells" Viruses, 第12卷, 2020年12月16日 (2020 - 12 - 16), 1-17 摘要、材料方法、图1	1-24
Y	刘金泽等. "一种用于 Red 同源重组的正反筛选表达盒的构建 及其反向筛选性能分析" 中国预防兽医学报, 第40卷, 第10期, 2018年10月31日 (2018 - 10 - 31), 902-907 摘要	1-24
A	WO 2020133772 A1 (中国科学院武汉物理与数学研究所) 2020年7月2日 (2020 - 07 - 02) 权利要求1-10、实施例1	1-24

☒ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2024年9月2日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

周茂新

电话号码 (+86) 010-53961922

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

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	CN 101724652 A (浙江大学) 2010年6月9日 (2010 - 06 - 09) 权利要求1	1-24
A	CN 1544625 A (浙江大学) 2004年11月10日 (2004 - 11 - 10) 权利要求1	1-24
A	LIU,X.J.等. "A Highly Efficient and Simple Construction Strategy for Producing Recombinant Baculovirus Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus" PLoS ONE, 第11卷, 第3期, 2016年3月23日 (2016 - 03 - 23), e0152140, 1-17 材料与方法	1-24
A	WESTENBERG,M.等. "Escherichia coli MW005: lambda Red-mediated recombineering and copy-number induction of oriV-equipped constructs in a single host" BMC Biotechnology, 第10卷, 2010年3月29日 (2010 - 03 - 29), 图1	1-24

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/000125

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)
WO	2020133772	A1	2020年7月2日	JP	2021513326	A	2021年5月27日
				JP	7134240	B2	2022年9月9日
				CA	3123692	A1	2020年7月2日
				EP	3693466	A4	2020年8月12日
				EP	3693466	A1	2022年10月19日
				KR	20210095926	A	2021年8月3日

CN	101724652	A	2010年6月9日	无			

CN	1544625	A	2004年11月10日	无			
