

(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
2023 年 11 月 9 日 (09.11.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/213008 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) **A01K 67/033** (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/105404

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 13 日 (13.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210482497.X 2022年5月5日 (05.05.2022) CN

(71) 申请人: 苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市相城区经济学路
8号, Jiangsu 215137 (CN)。

(72) 发明人: 贡成良 (GONG, Chengliang); 中国江苏省苏
州市相城区经济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。胡
小龙 (HU, Xiaolong); 中国江苏省苏州市相城区济
学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。王崇龙 (WANG,
Chonglong); 中国江苏省苏州市相城区经济学路8号,
Jiangsu 215137 (CN)。李楠 (LI, Nan); 中国江苏省
苏州市相城区经济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。
张星 (ZHANG, Xing); 中国江苏省苏州市相城区济
学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。朱敏 (ZHU, Min);

中国江苏省苏州市相城区经济学路8号, Jiangsu
215137 (CN)。童新宇 (TONG, Xinyu); 中国江苏省
苏州市相城区经济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。
邱群楠 (QIU, Qunnan); 中国江苏省苏州市相城
区经济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司
(SUZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK
AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州市姑苏区干将西
路93号5楼孙周强, Jiangsu 215002 (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, ME, MG, MK,
MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) Title: HIGH-STRENGTH SILK COMPRISING VARIOUS SPIDER SILK PROTEINS AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝及其制备方法

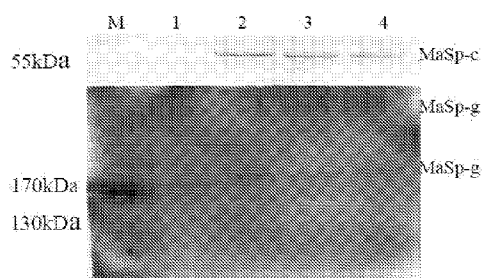


图 3

(57) Abstract: The present invention provides high-strength silk comprising various spider silk proteins and a preparation method therefor. The obtained silk comprises gold silk web spider major ampullate silk proteins MaSp - g and MaSp - c. By means of cloning the gene sequences of the spider silk proteins into plasmids, followed by transformation and recombination, and then transfecting cultured cells, recombinant virus particles are obtained. The recombinant virus particles are inoculated into 5-instar Bombyx mori for culturing to obtain chimeric silk comprising various spider silk proteins. The breaking strength of the silk reaches 1116.55 MPa, and the length of the silk reaches 65% of the length of pure silk.

(57) 摘要: 本发明提供了一种含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝及其制备方法, 得到的蚕丝含金丝网蜘蛛大壶状腺丝蛋白MaSp-g和MaSp-c。通过将所述蜘蛛腺丝蛋白的基因序列克隆入质粒, 再转化重组, 然后转染培养细胞, 得到重组病毒粒子, 将所述重组病毒粒子接种5龄家蚕, 培养获得含有多种蜘蛛丝蛋白的嵌合蚕丝, 其断裂强度达到1116.55MPa, 丝长达到纯蚕丝丝长的65%。



WO 2023/213008 A1

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, 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))。

一种含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域，具体涉及一种含多种金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白的改性蚕丝及其制备方法。

背景技术

[0002] 蜘蛛丝蛋白和蚕丝蛋白各具独特的特点，人们希望通过生物学的方法获取蜘蛛丝蛋白和蚕丝蛋白的混合物，以满足制备各种材料对丝蛋白的多样性的需求。但嵌合蚕丝的断裂应力（breaking stress）为371.3Mpa，比野生蚕的449.5Mpa低17.4%，嵌合蚕丝和野生蚕丝的断裂应变（breaking strain）分别为32.2%和22.5%，即嵌合蚕丝的延伸性增加但强度下降。另外，由于受到将外源基因导入家蚕的技术限制，通过显微注射通常只能将基因导入多化性品种蚕所产的卵，作为常识，生产上的实用品种均为二化性，因此通过遗传转化所获的转基因家蚕大多局限于无实用生产价值的多化性家蚕。

发明概述

技术问题

问题的解决方案

技术解决方案

[0003] 本发明的发明目的是提供一种含多种金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白的改性蚕丝及其制备方法，其断裂强度达到1116.55MPa。为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：一种含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝，所述多种蜘蛛腺丝蛋白为两种及两种以上不同的蜘蛛腺丝蛋白，优选的，所述蜘蛛腺丝蛋白为蜘蛛大壶状腺丝蛋白；所述蜘蛛为金丝织网蜘蛛。

[0004] 本发明公开了一种生产上述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的家蚕，将多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列克隆入质粒，再转化重组，然后转染培养细胞，得到重组病毒粒子；将所述重组病毒粒子接种家蚕幼虫，喂养至熟蚕，得到生产所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的家蚕。家蚕幼虫没有经过基因改造。本

发明公开了利用上述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝制备的丝素溶液。还公开了所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝在制备丝制品中的应用。本发明所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法为，将多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列克隆入质粒，再转化重组，然后转染培养细胞，得到重组病毒粒子；将所述重组病毒粒子接种家蚕幼虫，喂养至熟蚕，然后上簇、采茧、缂丝，得到含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝；具体的，多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列为SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2。

[0005] 本发明中，采用含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌转化，培养后挑取白色菌落，提取重组DNA；将转化得到的重组DNA转染草地夜蛾Sf9培养细胞，得到重组病毒粒子。

[0006] 本发明中，采用含有抗生素的桑叶喂养接种后的家蚕一天，然后采用未处理桑叶喂养至熟蚕，再用蜕皮激素处理一次，然后上簇。

[0007] 本发明家蚕的品种包括丝茧育实用家蚕品种、家蚕原种。与现有技术制备蜘蛛蛋白复合蚕丝的方法相比，本发明首次适用二化性蚕种，解决了现有技术难以用于二化性品种的问题。作为常识，生产上的实用品种均为二化性，所产卵为越冬卵，往往须通过较长时间的低温刺激（冷藏）或即时浸酸（盐酸）处理或冷藏与浸酸组合使用才可以解除滞育，促使胚胎发育。卵显微注射的最佳时期为产下后几小时，而即时浸酸处理通常在卵产下后24小时前后。显微注射后的蚕卵会因浸酸处理而死亡，因此现有技术只能选择不需要浸酸处理多化性品种；而且现有技术采用蜘蛛丝蛋白改性蚕丝时，丝长明显下降，都不到单纯蚕丝丝长的42%。

[0008] 本发明合成家蚕丝素蛋白轻链（FibL）基因启动子控制的5'端带有编码信号肽序列、3'端带有加尾信号的金丝织网蜘蛛（*Trichonephila clavipes*）的大壶状腺丝蛋白（major ampullate spidroin, MaSp）c基因表达盒FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}，其序列如SEQ ID NO: 1；合成家蚕丝素蛋白重链（FibH）基因启动子控制的5'端带有编码信号肽序列、3'端带有加尾信号的金丝织网蜘蛛（*Trichonephila clavipes*）的大壶状腺丝蛋白（major ampullate spidroin, MaSp）g基因表达

盒FibH-MaSp-g-polyA_{FibH}，其序列如SEQ ID NO: 2；将FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}和FibH-MaSp-g-polyA_{FibH}片段分别克隆进pFAST-Bac[™]-Dual的XhoI/SphI位点和NotI/PstI位点构建质粒pFAST-FibH/L-MaSp-g/c。

[0009] 进一步的，上述质粒pFAST-FibH/L-MaSp-g/c转化含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌，后涂布于分别含有10 μg/ml、50 μg/ml、7 μg/ml、40 μg/ml和100 μg/ml的四环素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG 和X-gal的LB 琼脂培养基平板上，于37℃培养，再挑取白色菌落，提取重组AcBacmid-FibH/L-MaSp-g/c DNA；将重组AcBacmid-FibH/L-MaSp-g/c DNA转染草地夜蛾Sf9培养细胞，于26~27℃培养至细胞发病，然后取细胞培养上清再次接种培养细胞，细胞发病后，收集细胞培养上清，离心纯化得到重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒粒子AcNPV-FibH/L-MaSp-g/c。

[0010] 最后，上述重组病毒AcNPV-FibH/L-MaSp-g/c接种5龄家蚕幼虫，用浸渍或喷洒过抗生素药液的凉干后的新鲜桑叶于24℃左右饲养1天，后用新鲜桑叶饲养至见熟蚕；再用浸渍或喷洒过蜕皮激素药液的新鲜桑叶饲喂蚕1次或直接用蜕皮激素药液体喷家蚕1次；将熟蚕移至簇具，在25℃环境下营茧，7天后采茧；蚕茧烘干后，经过缂丝获含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白g和c的蚕丝，为含两种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝。

[0011] 本发明构建FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}和FibH-MaSp-g-polyA_{FibH}表达盒的优选方案是根据SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2的序列采用全化学合成的方法；也可以家蚕基因组为模板通过PCR的方法分别获得家蚕丝素蛋白轻链（FibL）、重链（FibH）基因启动子以及相应的3'端带有加尾信号区域polyA_{FibL}和polyA_{FibH}；以家蚕丝腺组织总RNA、金丝织网蜘蛛主壶腹腺总RNA为模板，通过RT-PCR分别获得丝素蛋白轻链、重链基因的信号肽编码序列和金丝织网蜘蛛丝大壶状腺丝蛋白g、c基因的编码序列，然后通过搭桥的方法合成表达盒，也可以通过PCR扩增与化学合成相结合的方法制备表达盒。FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}和FibH-MaSp-g-polyA_{FibH}片段分别克隆进pFAST-Bac[™]-Dual（Invitrogen公司产品）的XhoI/SphI位点和NotI/PstI位点可以采用酶切连接的方法，也可以通过无缝克隆的方法。优化的方案是，通过超速离心从发病细胞培养上清中纯化

病毒粒子。重组病毒AcNPV-FibH/L-MaSp-g/c接种的家蚕品种优选丝茧育实用家蚕品种，如中2016×日2016，也可以选用家蚕原种；优选的接种的5龄家蚕幼虫的发育时期为5龄蜕皮后1-3天。接种病毒时可以用4号昆虫针蘸取收集的细胞培养上清或离心纯化的病毒穿刺接种家蚕幼虫，优化的方案是按 10^6 拷贝/蚕注射重组病毒AcNPV-FibH/L-MaSp-g/c。

[0012] 为了减少接种病毒时因接种伤口污染细菌而引起细菌性败血病的发生，本发明优选的抗生素为环丙沙星或氟哌酸或氟苯尼考。使用蜕皮激素的方法根据气候条件而定，当湿度较大时，浸渍或喷洒过蜕皮激素药液的新鲜桑叶凉干后饲喂蚕，当气候较干燥时，可直接用蜕皮激素药液体喷家蚕。

[0013] 杆状病毒是昆虫的病原，重组杆状病毒已广泛用于研发生物杀虫剂、表达外源蛋白和基因传递至脊椎动物细胞。杆状病毒种类繁多，且宿主域、感染性、致病性各不相同。金丝织网蜘蛛 (*Trichonephila clavipes*) 大壶状腺丝蛋白基因有2种，即MaSp-g和MaSp-c，二者间的序列和分子量存在显著差异，MaSp-g由2466氨基酸残基构成，分子量巨大，MaSp-c的分子量不大，由658个氨基酸残基构成。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒是杆状病毒的模式种，本发明通过重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒介导在家蚕后部丝腺同时表达金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白g和c，利用家蚕天然的纺丝习性，从而获取含有蛛丝蛋白g和c的嵌合蚕丝，相关技术方案没有见报道。

发明的有益效果

有益效果

[0014] 由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有下列优点：1. 通过大肠杆菌、酵母、动物细胞或转基因动植物能够表达出蜘蛛丝蛋白，要进一步获得蛛丝纤维，需要通过繁琐步骤纯化重组蛋白，再进一步通过人工纺丝实现，该过程不仅耗时费钱，而且目前的技术水平难以规模化生产，所制备的丝纤维的机械性仍大大低于天然蛛丝。利用本发明的技术，可以直接利用家蚕丝腺组织高效合成蛋白的能力和家蚕吐丝结茧的天然本领，大规模获得含有金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白g和c的嵌合蚕丝，且所获得的嵌合丝可聚集蚕丝和蛛丝优势。

- [0015] 2. 通过家蚕转基因的方法将蜘蛛丝蛋白基因导入家蚕基因组，须经过较复杂的程序进行转基因家蚕的筛选鉴定，进一步通过杂交筛选获得转基因纯系，历时1-2年时间，且多为表达一种蜘蛛丝蛋白基因；通过本发明的技术可以在较短的时间获取重组病毒，并通过该病毒接种5龄家蚕能在一周左右获得含有2种蜘蛛丝蛋白的嵌合蚕丝，其断裂强度达到1116.55MPa，丝长达到纯蚕丝丝长的65%，既解决了现有技术仅能用于实用性差的多化性品种的问题，又克服了现有技术复合丝长不到纯蚕丝丝长42%的缺陷。

对附图的简要说明

附图说明

- [0016] 图1为实施例一中重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c的PCR鉴定。
- [0017] 图2 为实施例一中PCR检测AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染家蚕丝腺中病毒基因的表达。
- [0018] 图3为实施例一中Western blot检测后部丝腺（中2016×目2016）中AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c表达的MaSp-g和MaSp-c。
- [0019] 图4为实施例一中AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕所产茧的性状。
- [0020] 图5为实施例一中AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕所产茧丝的红外光谱特性。
- [0021] 图6 为实施例二中的Western blot 检测丝腺中的MaSp-g/c。
- [0022] 图7为实施例二中免疫组化检测AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染丝腺中MaSp-g/c的分泌。
- [0023] 图8为实施例二中的Western blot 检测蚕丝中的MaSp-g/c。
- [0024] 图9为实施例二中的AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染蚕的茧丝机械性能。
- [0025] 图10为实施例二蚕丝红外光谱特征以及基于红外光谱特征的丝蛋白二级结构分析。

发明实施例

本发明的实施方式

- [0026] 通过piggyBac介导的家蚕转基因技术可获得含有蛛丝蛋白成份的嵌合蚕丝，且在一定程度上改善了丝纤维的机械性能，但该嵌合蚕丝中蛛丝蛋白的含量非常

有限；通过TALEN介导的同源末端重组已实现了用蜘蛛主壶腹腺丝蛋白基因经多次加倍的重复单元替代家蚕丝蛋白重链基因，这种方法获得的遗传修饰家蚕所生产的嵌合蚕丝中的蛛丝蛋白水平提高明显，尽管这种嵌合蚕丝的延伸性增加，但强度下降。此外由于受到通过显微注射将基因导入蚕卵的技术限制，目前对家蚕的遗传修饰基本上局限于无实用生产价值的多化性家蚕。利用本发明的技术可以利用实用家蚕品种高生产性能的优势获取具有蚕丝和蛛丝优秀性能的嵌合蚕丝。丝蛋白材料已广泛用于各个领域。蛛丝蛋白基因的重复单元经多次加倍后，利用基因工程技术已在大肠杆菌、酵母、动物细胞或转基因动植物中实现表达，但由于蛛丝蛋白氨基酸序列高度重复，往往表达水平极低，且表达产物的分子量低于天然。因此纯化重组蛛丝蛋白的成本很大，难以量产；本发明通过重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒介导在家蚕后部丝腺同时表达金丝织网(*Trichonephila clavipes*)蜘蛛大壶状腺丝蛋白g和c，并可以使重组蛋白通过吐丝进入茧层形成嵌合蚕丝，由此制备丝蛋白材料无需复杂的纯化步骤，便于量产。

[0027] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述，本发明涉及的具体操作以及养蚕方法与表征，都为常规技术。委托商业公司进行化学合成，合成的序列如SEQ ID NO: 1，在序列的二侧分别有 XhoI和 SphI位点。委托商业公司进行化学合成，合成的序列如SEQ ID NO: 2，在序列的二侧分别有 NotI和 PstI位点。

[0028] 实施例一中2016×日2016品种家蚕：（1）重组质粒pFast-FH/LP-MaSp-g/c的构建：将SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2序列分别克隆进pFAST-Bac[™]-Dual（Invitrogen公司产品）XhoI和 SphI位点、NotI和PstI位点之间制备重组质粒pFAST-FH/LP-MaSp-g/c。

[0029] （2）重组Bacmid

AcBacmid-FH/LP-MaSp-g/c的筛选：将pFast-FH/LP-MaSp-g/c转化含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌，后涂布于分别含有10 μg/ml、50 μg/ml、7 μg/ml、40μg/ml和100 μg/ml的四环素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG 和X-gal的LB 琼脂培养基平板上，于37℃培养12小时后，挑取白色菌落，接种在含有10 μg/ml、50 μg/ml和7 μg/ml的四环素、卡那霉素、庆大霉素LB培养基中，振荡培养8小时，

提取重组AcBacmid-pFast-FH/LP-MaSp-g/c DNA。

- [0030] (3) 重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c构建与鉴定：将重组AcBacmid-FH/LP-MaSp-g/c DNA 2 μ g与脂质体Lipofectamine 2000 (Invitrogen公司)混合，转染草地夜蛾Sf9培养细胞，于27℃培养4天，然后取细胞培养上清再次接种培养细胞，细胞发病后，收集细胞和细胞培养上清，以提高病毒的滴度。提取细胞总DNA，分别用引物对 lightF (SEQ ID NO: 3) 和lightR (SEQ ID NO:4)、引物对heavyF (SEQ ID NO: 5) 和heavy R (SEQ ID NO: 6) PCR 鉴定MaSp-c和MaSp-g基因，扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示，可从AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c DNA中分别扩增出代表MaSp-c (图1中A) 和MaSp-g (图1中B) 的基因片段，说明重组AcNPV-FibH-MaSp-g/c的DNA中含有MaSp-c和MaSp-g基因。AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c病毒粒子的纯化与病毒拷贝数的测定：上述细胞培养上清，在4℃条件下，8,000转/分钟离心10分钟，反复2次；取上清，以30,000转/分钟离心30分钟，取沉淀，用磷酸缓冲液溶解沉淀获重组病毒的贮备液，-20℃保存备用。取病毒的贮备液，提取病毒DNA，用P4-F (SEQ ID NO:7) 和P4-R (SEQ ID NO:8) 通过定量PCR测定病毒的拷贝数。

- [0031] (4) 重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c (贮备液) 接种家蚕：“中2016×日2016”品种家蚕饲育至5龄起蚕，按每条蚕接种 10^6 拷贝的病毒。以 10^3 、 10^4 、 10^5 为对比。

- [0032] (5) 接种病毒的蚕添食抗生素环丙沙星：配制500mg/L的环丙沙星溶液，按6L溶液/100公斤桑叶均匀喷洒于桑叶叶面，喷洒环丙沙星溶液的新鲜桑叶凉干后喂养上述接种家蚕1天，尔后用新鲜桑叶在24℃左右饲养至见熟蚕。PCR检测病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c在家蚕中的增殖：AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c接种家蚕后，按感染后24、48、72和96小时取蚕的血液200 μ l和100mg后部丝腺，提取DNA，用P4-F (SEQ ID NO:7) 和P4-R (SEQ ID NO:8) 通过定量PCR检测病毒的拷贝数。检测结果如图2所示。随着病毒的感染，后部丝腺组织中病毒的拷贝数呈增加趋势。Western blot检测丝腺组织中的重组蛋白MaSp-g/c：AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染5龄家蚕

96小时后，取不同蚕的后部丝腺，经过SDS-PAGE分离后，用MaSp-g/c抗体进行Western blot检测，如图3所示，在病毒感染的丝腺组织中可检测到代表MaSp-c（55 kDa）和 MaSp-g（>170 kDa）的信号条带，说明MaSp-c和MaSp-g基因已翻译成蛋白。

[0033] （6）家蚕添食蜕皮激素：配制22.5mg/L的蜕皮激素药液，按5L溶液/100千克桑叶喷洒新鲜桑叶，凉干后，饲喂上述见熟蚕1次；将熟蚕移至簇具，在25℃环境下营茧，7天后采茧。蚕茧的外形和茧质调查：5龄起蚕分别接种 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 拷贝/条蚕病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c，各个处理区的蚕茧烘干后，观察茧形，没有发现接种病毒引起明显的茧形变化，调查接种 10^6 拷贝病毒的蚕的干茧重、茧壳重以及丝的长度，与没有接种病毒的对照相比，参见图4。

[0034] （7）制备含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白MaSp-g/c的嵌合蚕丝：蚕茧烘干后贮藏。缂丝前，贮藏干茧脱胶后，经过缂丝获得含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白MaSp-g/c的嵌合蚕丝。MaSp-g/c的嵌合蚕丝性能检测结果如表1所示。其中对照为未注射病毒蚕的丝；MaSp-g/c为接种 10^6 病毒的蚕的丝。蚕丝的断裂应力Breaking stress、杨氏模量Young modulus、断裂能Breaking energy明显增加，截面积Average areas下降明显，断裂应变Breaking strain略有减少。

[0035] 表1 AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕的丝的机械性能

	Breaking stress (Mpa)	Breaking strain (%)	Young modulus (Gpa)	Breaking energy (J/m ²)	Average areas (μm ²)
对照 (n=15)	651.08	18.47	3.95	510.19	105.93
10^6 AcNPV-FLP-MaSp-g/c (n=26)	1030	15.167	6.8	691.07	85.41

。

[0036] MaSp-g/c的嵌合蚕丝蛋白的二级结构检测：AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕所产茧经脱胶缂丝后，进行红外光谱分析。根据红外光谱的特征，计算丝蛋白中二级结构的比例，参见图5。与未注射病毒的对照蚕的丝相比，感染病毒AcNPV-FH P/FLP-MaSp-g/c蚕的丝蛋白的二级结构中β-折叠的含量增加15.8%，而α-螺旋的比例基本不变。

[0037] 图1为上述重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c的PCR鉴定。提取AcBacmid-FH/LP-MaSp-g/c转染后发病细胞的总DNA，用引物对lightF (SEQ ID NO:3) 和lightR (SEQ ID NO:4) PCR检测MaSp-c基因，引物对heavyF (SEQ ID NO:5)，引物heavyR (SEQ ID NO:6) PCR检测MaSp-g。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。图A，MaSp-c基因检测结果。泳道M，标准分子量DNA；泳道con，重组质粒pFast-FH/LP-MaSp-g/c；泳道1、2和3，重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c。图B，MaSp-g基因检测结果。泳道M，标准分子量DNA；泳道con，野生病毒；泳道1、2和3，重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c。图2 为上述PCR检测AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染家蚕丝腺中病毒基因的表达。10⁶拷贝的AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c接种“中2016×日2016”5龄家蚕后，按感染后24、48、72和96小时取蚕的后部丝腺，提取DNA，用引物P4-F和P4-R通过qPCR检测重组病毒中庆大霉素基因片段，随着病毒的感染，后部丝腺中的病毒拷贝数增加。图3为上述Western blot检测后部丝腺（中2016×日2016）中AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c表达的MaSp-g和MaSp-c。泳道M，标准分子量DNA；泳道2，未感染病毒对照；泳道3-5，分别为感染病毒96小时的不同家蚕的丝腺。一抗为抗MaSp-g/c抗体。图4为上述AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕所产茧的性状。A，蚕茧的外形，10³、10⁴、10⁵和10⁶，接种病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c的滴度分别为10³、10⁴、10⁵和10⁶拷贝/条蚕；B，干茧重；C，茧壳重；D，茧丝长。con，对照；MaSp-g/c，接种病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c。图5为上述AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c感染蚕所产茧丝的红外光谱特性。A，蚕丝的红外光谱。con，未感染病毒的蚕的丝；13-1，感染10⁶拷贝病毒的蚕的丝。B，基于红外光谱特征的丝蛋白的二级结构分析。Negative control，未感染病毒的蚕的丝；10⁶，感染10⁶拷贝病毒的蚕的丝。

[0038] 实施例二 7532品种家蚕：（1）重组病毒AcNPV-FH/LP-MaSp-g/c为实施实例一步骤（3）的细胞培养上清。

[0039] （2）重组病毒AcNPV-FibH-MaSp-g接种家蚕：“7532”品种家蚕饲育至5龄起蚕，按每条蚕接种10⁶拷贝的病毒。以10³、10⁴、10⁵为对比。

[0040] （3）接种病毒的蚕添食抗生素氟苯尼考：配制500mg/L的氟苯尼考溶液，按6L

溶液/100公斤桑叶均匀喷洒于桑叶叶面，喷洒氟苯尼考溶液的新鲜桑叶凉干后喂养家蚕1天，尔后用新鲜桑叶在24℃左右饲养至见熟蚕。Western blotting检测丝腺组织中的重组蛋白MaSp-g/c：取感染 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6

拷贝的病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染72小时的家蚕后部丝腺，用MaSp-g/c的抗体进行Western blotting检测，同时以微管蛋白作为内参。检测结果如图6。在感染病毒的后部丝腺中可检测到代表MaSp-g (>170 kDa) 和MaSp-c (55kDa) 的信号条带，说明MaSp-g和MaSp-c基因已翻译成蛋白。

[0041] 组织免疫荧光检测重组MaSp-g/c在丝腺细胞中的分泌： 10^6

拷贝的重组病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染5龄家蚕48、72、96小时后，取丝腺组织制作石蜡切片，用MaSp-g/c抗体通过组织免疫学的方法检测丝腺细胞表达的重组蛛丝蛋白的分泌，结果如图7所示。感染AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c的丝腺腔中可观察到代表MaSp-g/c的棕色信号，且随着病毒的感染，腺腔中的信号强度增加，说明重组MaSp-g/c分泌进入腺腔并积累。

[0042] (4) 家蚕体喷蜕皮激素：配制22.5mg/L的蜕皮激素药液，体喷步骤3的蚕，以蚕体表湿润为宜；将熟蚕移至簇具，在25℃环境下营茧，7天后采茧，蚕茧烘干后贮藏。缂丝前，贮藏干茧脱胶后，经过缂丝获得含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白MaSp-g和MaSp-c的嵌合蚕丝，丝长达到对照蚕（未感染病毒，即纯蚕丝）丝长的63%。Western blotting 检测蚕丝中的MaSp-g/c：取上述嵌合蚕丝，用常规溴化锂溶液溶解蚕丝。溴化锂溶解后的蛋白溶液加入到透析膜中，透析72小时后进行用MaSp-g/c抗体进行Western blot检测。如图8所示，在病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染5龄家蚕的丝样本中可检测到代表MaSp-g (>170 kDa) 和MaSp-c (55kDa) 的信号条带，说明制备的丝中含有MaSp-g和MaSp-c。AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染蚕的嵌合丝的性能检测：测定接种 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 拷贝的病毒组的丝的应力-应变曲线（图9），进一步计算丝的机械性能，结果显示，接种病毒组的蚕丝的断裂应力Breaking stress、杨氏模量Young modulus、明显高于未接种病毒对照组，且具有接种病毒拷贝数依赖性；丝的截面积Average areas明显低于未接种病毒对照组，断裂应变Breaking strain与对照相比略有减少，但断裂能Breaking energy低于对照组，且有接种病毒拷贝

数依赖性（表2）。红外光谱检测结果如图10所示，根据红外光谱检测结果，计算丝蛋白中二级的比例，接种病毒组的丝蛋白中的 β -折叠的比例高于对照组，且随接种病毒拷贝数增加，丝蛋白中 β -折叠的比例增加，具有剂量依赖性。

[0043]

表2 实施例二中的 AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c 感染量的蚕丝机械性能

Groups	Breaking stress (Mpa)	Breaking strain (%)	Young modulus (Gpa)	Breaking energy (J/m ²)	Average area (um ²)
10 ⁻⁶ AcNPV-FHP-MaSp-g/c infected (n=12)	1116.55	18.04	6.19	966.62	74.51
10 ⁻⁵ AcNPV-FHP-MaSp-g/c infected (n=14)	838.47	18.42	4.33	838.81	77.79
10 ⁻⁴ AcNPV-FHP-MaSp-g/c infected (n=14)	797.56	17.44	4.78	666.47	119.30
10 ⁻³ AcNPV-FHP-MaSp-g/c infected (n=14)	684.34	17.55	4.54	681.9	136.00
Control (n=6)	684.84	19.30	3.55	1372.31	163.36

。

[0044]

图6为上述Western blot 检测丝腺中的MaSp-g/c。10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶拷贝的病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染5龄家蚕，72小时后取丝腺组织，用MaSp-g/c抗体进行Western blot检测。泳道M，标准分子量蛋白；泳道con，未感染病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c蚕的丝腺；泳道10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶，感染10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶

拷贝的病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c蚕的丝腺。一抗为抗MaSp-g/c。内参为微管蛋白，检测抗体为抗微管蛋白抗体。图7为上述免疫组化检测AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染丝腺中MaSp-g/c的分泌。A，对照蚕的丝腺；B、C和D，5龄蚕感染病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c

48、72和96小时的丝腺。一抗为抗MaSp-g/c抗体。图8为上述Western blot 检测蚕丝中的MaSp-g/c。泳道M，标准分子量蛋白；

泳道con，未感染病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c对照；泳道1、2和3，5龄家蚕接种106拷贝的病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c蚕的丝。一抗为抗MaSp-g/c。图9为上述AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c感染蚕的茧丝机械性能。A，5龄起蚕接种不同滴

度病毒AcNPV-FHP/FLP-MaSp-g/c蚕的茧丝的机械性能。Con, 未接种病毒组丝的应力-应变曲线; 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 , 分别接种 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 拷贝的病毒组的应力-应变曲线。图10为上述蚕丝红外光谱特征以及基于红外光谱特征的丝蛋白二级结构分析; Con, 未接种病毒组丝红外光谱图; 1、2、3和4分别接种 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 拷贝的病毒组的丝红外光谱图; Negative control, 未感染病毒的蚕的丝; 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 , 分别接种 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 拷贝的病毒组的蚕的丝。

[0045] 随着DNA测序技术的进步, 人们已解明了多种蜘蛛丝蛋白基因的序列。十多年以来, 人们试图通过基因工程技术大量表达蜘蛛丝蛋白, 进一步通过纺丝工程技术机械制备蜘蛛丝, 并取得了较多的进展。目前已能够在细菌、酵母、哺乳类动物细胞、昆虫等表达系统中表达多种蜘蛛丝蛋白全长基因或重复区域的重复片段, 甚至也能够通过转基因动植物表达蛛丝蛋白。在自然界, 蜘蛛通过丝蛋白的自主装配和蜘蛛与世俱来的纺丝习性, 将丝蛋白纺成丝纤维。由于基因工程表达的重组蜘蛛丝蛋白不能够自主装配, 必须进一步通过人工纺丝才能加工成纤维。但目前通过人工纺丝还不能大量获取机械性与天然蜘蛛丝相当的纤维。蜘蛛丝蛋白组成独特, 特别是主壶腹腺丝蛋白, 分子量巨大。研究表明, 当外源蛋白的分子量高于60kDa时, 表达水平呈现明显的下降, 当用大肠杆菌表达蜘蛛牵引丝蛋白基因片段超过3kb时不仅基因表达效率降低, 且有表达提前终止现象。另外, 蜘蛛丝蛋白通常有4种通用的氨基酸模块: (1) GPGXX, (2) GGx, (3) An/ (GA)n和(4) 间隔区 (spacer)。蜘蛛丝蛋白且多为这些模块有规律的高度重复。因此, 当用异源系统表达时往往重组蜘蛛丝蛋白分子量低于自然状态, 且表达水平极低。由于重组蜘蛛丝蛋白的分子量低于自然状态, 加上人们还没有能完全模仿蜘蛛的吐丝过程, 因此人工纺丝所获得的丝的机械性能与低于天然蜘蛛丝。家蚕是唯一能室内规模饲养大量提供丝纤维的昆虫。蚕丝蛋白主要由丝胶蛋白和丝素蛋白组成, 而丝纤维主要由不溶于水的丝素蛋白重链 (350kDa)、丝素蛋白轻链 (25.8kDa) 以及P25蛋白 (25.7kDa) 按6:6:1的摩尔比装配而成, 蚕丝蛋白的机械性能主要由丝素蛋白重链的高分子量和氨基酸序列的高度重复决定。近年来, 蚕丝纤维或蚕丝蛋白已广泛用于医用生物材料

研发。通过家蚕转基因的方法将蜘蛛丝蛋白基因导入家蚕基因组，须经过较复杂的程序进行转基因家蚕的筛选鉴定，进一步通过杂交筛选获得转基因纯系，历时1-2年时间，且多为表达一种蜘蛛丝蛋白基因；通过本发明的技术可以在较短的时间获取重组病毒，并通过该病毒接种5龄家蚕能在一周左右获得含有2种蜘蛛丝蛋白的嵌合蚕丝，其断裂强度达到1116.55MPa，丝长达到现有技术的65%，既解决了现有技术仅能用于实用性差的多化性品种的问题，又克服了现有技术蜘蛛蛋白复合蚕丝丝长不到纯蚕丝丝长42%的缺陷。

序列表自由内容

[0046] SEQ ID NO:

1: ctcgagggtacgggttcgtaaagttcacctgcggctatattccgactcgccaagttacgtcagtcgta
ttgtaatgagcgatttagtgggcaacttcattctgttaattttgtgtcacgggtgcgcgcgcacgcgtaaa
acttcactctcatagatcccccataacgcgcctaaagaagtataacttcaataattttaatttaaaaaa
aaacatgcatagaataattatatgaattatttaaaatgtcatttaccgacattgacataacagacgacg
ttaacactacaaaacattttaattccacattgttacatattcaacagttaaatttgcgttaattctcga
tgccaacaaatataagaacaatcggatcaattagatcgctttgtttcgaacaacacttagtttaactag
aggcgtagacctcaagaaatcatcttcattagaaactaaaccttaaaatcgcaataataaagcatagtc
aattttaactgaaatgcaaagctttttgaacgttagatgctgtcagcggttcgttggtacagttgtttga
tatttatatttaattgtctttttatatataaatagtggaacattaatcacggaatcctgtatagtatata
ccgattgggtcacataacagaccactaaaatgaaacctatcttcctcgttctgctgggtgggtacatctgc
ctatgccgccccatgggtcttcgacggagttggccgacgcttttatcaacgctttcctcaatgaagccgg
aagaactggcgctttcacccgacgaactcgacgatatgtctaccattggtgacacctgaaaacagc
tatggataagatggccagatccaacaaatcatctcaatcgaagctccaggtctgaatatggctttcgc
ttcatcaatgggtgaaatcgctgccgtggaacaaggtggattgagcgttgctgaaaaaacaacgctat
tgccgattccctcaattcggtttctaccaacaactggagccgttaacgtccagttcgtcaatgaaat
aagaagtctcatctcaatgttcgctcaggccagcgctaacgaagctagctacggcggtggatacggcgg
tggaacaaggcggtcaatctgctgggtgctgccgctgccgctgggtgctggacaaggtggttacgggtggact
ggcggtcaaggtgctggtagtgccgctgccgctgccgcttcaggagcaggtcaaggtggttatggtgg
agtgggaaccagggtgctggaagaggcgccggagccgctgccgctgccgctggcggtgctgggtcaagg

tggttacaatggtggacaaggaccttctgccgctgccgctgccgctgccagcggagctggccagggcgg
ttacggaggccctggttcccaaggctgctggacaaggagctggagctgccgctgccgctgccggtggagc
tggacaaggcggttacggaggcttgggtggacaggagctggaagaggcgggtgctgccgctgccgctgc
cgctgccggtgtggctggacaagggtggtctgggttcgcagggtgctggaagagggtggactcggcggtca
gggtgcaggcgtgccgctgccgctggaggcggcgacagggtggatacgggtggtctgggacaagggtgc
tggtaaggagctggagtcgccgctgccgctgccgctggaggcgtggccaagggtggatacggcggttt
cggttcccaggagcaggaagagggtggtcaagggtggacaagggttcggccgctgccgctggcggtgctgg
gcaaagaggttacggaggccagggtgctggtcagggtggattgggcgggtggagaacaggagctggcga
agaaggttctggtgccagcgtggcgctggtgccgctgccggaagaggcgtggcggtggaggcaagggt
tggactgggcgggtcaagggtgtagtgctgccgctgccgctgccggtggagctgggcaaggcggtttggg
aggctcaagagggtgctggacaagggtgctggagctgccgctgccgctgccggtggagctggtcaggcggt
ttatggaggcctgggctcacaaggagctggttagagggtggacaaggcgtggtgctgccgctgccgctgc
cgcggtgctggccaagggtggttacgggtggactgggcgggtcaggcggttggtagagggtggtctgggtgg
tcaagggtgcagggtgctgccgctgccgctgggtgctggacaggcggttacggaggcgtgggatctggtgc
ttcggtgccagtgctgccagatctagattgtcgagtcctcaagcttcatctagagttagctccgctgt
ttcgaacctcgctgccagtgggtccaacaaattcagctgccctgtcgagtactatttcaaactgggttc
tcaaataggagcttctaattcctggactgagcggctgcgacgttttgatacaggctctgttggaaagtcgt
gtcagccttgatccaaattctcggttcatctagcatcggacagggtcaattacggctcagcgggacaggc
tacgcaaatagtgggacagtcagtcctaccaggctttaggataaataagaactgtaaataatgtatatat
ataattatataaaaagatatataaccatatacaaacatatataatcattataagacaatctacctatat
aaaaacagactaaaattaataattatgtatactttaattgtgtttaggacattttatgcaaattgtgtt
tgcgttaggatttttttttggaaagtttttttagattatttatgaatatataaaataataacgttaatata
atatatatattatataaatcaacgacacggcttttcattttggatgatcaatcttattgtttcttctaat
tgattttttgtacaataaagatgtatccagttttccagataaagaatttagtttattttctggtccc
cattaaaataagttacgggtattcgacaatagcatgc。

[0047] SEQ ID NO:

2: gcggccgctcaaagcctcatcccaatttggagtcactcaagacatccttgattaaggcagctgccg
atattgacatggacctcggttcgtgctgcgatagacgactggccgcgcagattgaaggcctgtattcaaa

atcacggagggtcattttgaataaaacttttagtgtcataagaatctatgttttgtaagttcattttggta
tatgaatggttacataatgaataaaacttggttcaattattttacattaaacatgtgacagaatttatga
cctgactaggttaggtacaaacagcctttttgatattagaaaactaagtaaaatagcctacggtcacatc
tctttccgtgggtgtcgttaaagggcgacttagagaaccaccaagaacgtagcagaatcctcagagtgt
cataccagcatacagccatcgctaactgctattttactggtaatagggcacattgtaatctcacttaacc
atactgtcggggccaccatctagcctattttctgccacgaatcaatcgtgagtgtgacatagagaaact
attagttgagaagaaaacaagagcactaaaggtttgatattgacaaaaatctacttcgccgtcactcca
taggtttattgtctctcattagtcagaaacagcagttacagacgtaagcttttacgcacaaactacagg
gttgctcttttattgtatcgaaaatatgggacctgaataagggcgattttgacgcgtcctgccccccat
tccgatcctacggacagaatggcaagcagtcgacgtcgcccaaacacgtcatttcggatcctcagga
tccactaacggtgcttttaggtacctcaagcacgggtcatcgttctcgtcggaccgctcgttgcgacga
agggtcgcagagcaaattaaccctcagacacagcccactgagtttctcgccgatcttctcagcgggt
cgcgtttccgatccggtggtagattctgcgaagcacggctcttgctaggattcgtgttagcaacgtcgt
caggtttgagccccgtgagctcacttactagtttaagggttacgctgaaatagcctctcaaggctctcage
taggttaggaacaaaaaaaaaagtcctgcccttaacaccgttgcatggcttgcttttgagaaagatg
ttttgtacggaaagtttgaataagtgttaattgcaagtaacgtaacaatgttttaggggttcggctctc
aataaattcgaccaataaaccatataatgtcgtgctaattactggacacattgtataacagttccactgt
attgacaataataaaacctcttcattgacttgagaatgtctggacagatttggtttgtatttttgatt
tacaatgttttttttggtgatttaccatccaaggcattctccaggatggttggtgcatcacgccgatt
ggcaaacaaaaactaaaatgaaactaaaaagaaacagtttccgctgtccggttcctctagtgggagaaa
gcatgaagtaagttctttaaatattacaaaaaaattgaacgatattataaaattctttaaaatattaaa
agtaagaacaataagatcaattaaatcataattaatcacattgttcatgatcacaatttaatttacttc
atacgttgatttggttatgttaaataaaaaagattaatttctatgtaattgtatctgtacaatacaatgtg
tagatgtttattctatcgaaagtaatacgtcaaaactcgaaaattttcagtataaaaagggttcaactt
tttcaaatcagcatcagttcgggtccaactctcaagatgagagtcaaaaccttcgtgatcttgtgctgt
gctctccaatacgtggcctacacaaacgctccatggagcgacaccgctacagccgatgctttcattcaa
aatttctcgggtgccgtctccgatctggtgctttcaccctgaccagctggacgatatggctactgtg
ggagacaccattatgtccgcatcgataagatggctagaaacaataagtcataagagtaagctccag

tcactgaaaatggccttcgcttcatcaatcgctggtattgctgccgttgaacaaggtggacagtcgatg
gacatcaagaccaacgccattgctaatagccttggattcggttttctacatgacaactggaagtacaaac
caacagttcgtcaatgaaatgagaagtctcatatcaatgatctctgctgccagcgccaacgaagctagc
tacggcggtggagcttccgctgccgctgccacagctggcggttacggtcaaggagcttccggttacgat
cctggactgtccccagcttcggctgccgctcctagtggctacggtccatcaaagagagaaccttcaggt
attggtgccgctgccgctgccccatctgaatacggttcgagtcaacagggcccgagtgggtacaaaagct
gccactatcgctgccgctaagagaggccccactagctacggtcctagacaacaacgccctgggtggttct
ggagctcctgccgctaccgctggtagaggaccgggtggatacggacccgaacaacaaggacctagagge
tcaggagccgctgccgacgaagctggaccaggacaacaggaaccgggtgctgatgctgccgctgccttc
ggtagtggatcaggcgaacaggggtccaggaagattcgacgctgccgctgccactgctaaatcgagagge
aatggtcctggacaacagggctctgggtgtcgcttcagctgctgctgctggttagtgaaccagaggatac
ggccctgggtcaacaagctcacagaggacacggcgctgccgctgccgctactggaagcggcggttacgaa
ccaggacaacaaggacctgggtggctccttccgccgctgccgctgggtttgggaccaggtggatacggctccg
agaaaacaaggacaaagaagaccgccgctaccgccgctgccgctgaaacaggcggttacggtcctaga
atacagggaacaggagccgctgccgctgccgctaccggaagaggaccggaggctacggtcctggacaa
caggttccaggtggatctggagctgtcaaggccgctgatggacctgaaagtttcgacctgggtcagcct
ggcggtcctggagccgctgccacagctggcgccagaagaggaccgggaggctacggacctggacaacaa
gaacctggaagaccatctgtggctgccgctagtgtggctcaggtggatacggctcctagacaacaggga
ccaggcggttacgctccgggacaacagggctcctggagtctcctgggtgctactggagccgctgccgctggc
agaggttcaggatacgtaatggcaaaaaggtcccgggaggccctggcgccgctgccgctgccgctact
gggtctacacctggagcttacggccctgggtcaacagggaccaggtggagacgatccgaaacaacaggt
cccgcctcatctagcgctacagaagccgctgccggacctagaggatacggcccaggtaaacaaggtcct
gggtgctgccgtcgctgttgctgccggttctggaccggcggttacggccctcgctcagcagggtcctgga
ggcccagctataggcccaggtgtttacggaccgggccaacagggtaaaagagtctacgggtcccggtcag
caaggacctgggtggattcggtgctgccgctgccactgctgccggccctgggtgactacgggtcctgataag
agaggaccggcggtcctggagttgctgccgctggaagaggcagcggttagaccaggatccgccgctgac
gctacagccggatctgggtcccggaggctacgggtccaggacaacaaggaccaggagccgctgccactgct
gcctctggatctggaccgggtgtttacagaccagacaatctgggtggaccaggtgctgccgtcggagct

gctactagaagaggatacggctacggaccaggacaacagggtcctgagggaccaggagctgttgctgcc
gctgccgctggatctgaacctggcggttacggaccaggccaacagggaaggttacgtcagtgg
gaacaggagccaggagattctggatcgccgctgccgcttctcggtcctggagtgtctggacccaacaa
cagggccctggtgaaaaggccgctgccgctagtggatcaggcacaagaggttatggtccaggccaacaa
ggtccgggaggccctggtgccgctgccgctactgaagctggtagaggatcaggtggatacggcccaggt
caacagggtccggaaggatctggcggtgccgctgccgctgccgctcgtcccgcggttacggtctcgga
caagaaggcccaggttcggccgctgccacagctgccggaagaggaatagaaggtcacggacctggccaa
caaggacctggaggcccaggtgctgccgctgccgctgccaccggttagaggacaaggtggatacaaacc
ggtcagaagggacctggcggttacggaacaagacaacaaggacctgaagaacctggttctgatgctgcc
gctactaatggcaccggtctcggacaggaaggacctggaggccctgttactgccgctgtcggcgctggc
tctggtcaacagaagttgagtccgctgccgctgccaccgctggaagaggattgggtggatatggacca
ggacaacaaggtccggctgccactgctaccacagctggccgcggtctggcggttactggagctgccgct
gaagccgctgccggacctggtcccgaggctatggacctggacaacaggaagctggcggtgctgggtgaa
gctgccgaagctgccggccctggtcctccaccgcaaggacctggcactgctgccatcgctgccgctggt
agtgtgccaggtggatacgttctggacagagaggtaccggcggtccagccgctgccgctgccactggt
ctcggaggctacaaaccgggtcaacagggacctggtggatacgtccaggccaaaagggtctggaagct
accgctgccggttagaggaagcggtacgggtcccgctaaacagggtgccggcggtcctggagctgccgct
gccgctgccgaacctggacccccctggcgaatacggctacagaaaaagaggaccgaaaggagacggacca
aaacagcaagctgccgctggatcctcgccgctgccgctgccggcagttcagctgccgctgccgctaca
ggctcctcaaggttatggtcctggacaacaaggtcctggagctactgcctcgccgctgccggaagtaga
cccgtcagatacggacctggtcaaaagggacctggtgcaggaccggaggctacgaacctggtcagcaa
ggtcctggtggacctggaagcgctgccgctggcccaggcggttacggtccggctcaacaaggacctggt
gtgccatccggcgctgccggcagaagaggtttgggatacggccccggtaaacatggacctagecgtgcc
gctgccgctgccgctggaagcgccctggtggttacggtccgggacaacagggttaaaggtggatatggt
cccgttaaacaagaacctggttaacttcggggccgctgccgctgcctcgggaccaggcggttacggaccg
ggcaaagaaggtcccgaagtgtgatgctgccgctgccagaagaggacctggaggctacggcccaaaa
caaaaagggtgctgccgctatggccgctgccgctgccggttcaatccctgaaggctacggtcccgtcaa
caaggacctggcggtgctcaggagctgccgctgccactacctctgaaccggtgggttacggagctggccaa

gaagggtcacggagcagtcgctgccgctacagctggcagaggtccaggtggatacagaccgggctgtac
gggtcccggcggttctggtagcgccgctgaagccgctggacctggaggctatggttcaaaacaacagggt
acaatttctactgccgctgccgctgccggatcagaacctgggtggatacggacctggtcagcaaggaccg
ggcggttctggagttgctgccgctaccgaagaaagaagagaacccggaggctacaagcctggtcagcaa
ggccctgggtggaccatctgtggccgctgcctctgctggcctcggcggttacgggtccaggacagcaaggt
ccgggaggcccaaatggacctgggtcaacagggtcctgggtggatcaggtgttgctgccgctactgaagaa
agaagagaaccaggcggttacaagccgggtcaacaagggtcctgggtggctccttctgtggccgctgcctcc
gctggactgggtggatacggccctggacaacaaggaccggcggtccttctgttgctgccgctagtgtct
gaattgggagggtacggccccagacagcaaggccctgggtggatacgtcctgggtcagcagggtccgggc
ggttacgctccaggtagacaagggtccaggagttccttgtgctgctacagccgctggcgctggttctgggt
tatggtcctggccaacagggtccccggaggcccaggaacaactgccgctgccgctgccggaagcacttct
gtcgaatacggacctggccaacagggtagaaaagggtgacggacctaaagcaacagggtccagccggatct
agcgatgctgccgctgccgctggccccgagaggctatggccctggacaacagggtacctgttgccgctgcc
ttggctgccgctggctctgggtccagtggttatggacctgggtcaaagaggacctgggtgccgctgtggt
gcttctgctggttagcggacctctcggtacgggtccaagacaacagggtcaagtgggacacggcagagcc
gctactgctgaagccggtagaggaccggcggtttacgagcctggagaacaagggtccaggtggacctggt
tcagccgctgccgctgccggtcctagaggatacagaccacgtcagcaagggtcctggagttcacggagct
gctaccgctagaagaggctctggatacggaccaggccaacaaggacctgaagctccaggtgctgccgct
gccacagctgccggttctgggtcccggcggttacggacctggtaaacagggtaaagggtggttacgtccca
ggacaacaggagcctggcgactttggagctgccgctgccgctagtgggtcaggtggatacggacctgga
agcgccgctgccgctgccgctggtagaggaccggcggttacgggtcctaacaacagggcgctggtgct
atggcttcaaccgccgctggatctatccctgggtggttacggacctggacagcaagggtcctggtcagcaa
ggaccaggtgacttcggtgccgctgccgctgaagctgcttccggaccaggtggatatggtcctggacag
gaagttcctgttctgtggctgttgccgctgccggttagaggaccaggcggttacagatcaggacaacaa
ggaccgggaggcttcggatctactgctgccgctgccggtcccgggtggatatggtcctgggtcaacaagggt
cccgaacagttgctgtggctgccgctgaatctgggtcctggcggttacggtactgggtcaacaaggccct
gggtggtcctagcgccgctgccgcttccgctgggtccgggtggatatggccctgggtcagcaaggacctgga
gtgcctggagctgttgctaccgccgctgccgtgagagggttctggatacggcgctggtcaacaagttcca

ggcggctcctgggtgctgccgctgccaccgtcaccggtagaagacctggaggctatggcccaggccaacaa
ggctcctggaagattggatgctgccagcgtgccgctggccctgggttcctacggctcctgaacaacaggga
ccagttgctagtgccgctggaagaggccccggtagatacgggtactgaacaacaggacgtggcagatac
ggtaccgggtcaacaggggccccggtagacctgtcacagccgctgtggattctggcagcgaacaacagggt
ctgtcggccgctgccgctgccgctgccggacgtggcaacgggtggatacttgccctgggtcaacaaggacce
gctgtggctgccgctgccgctggctgtggactgggcggttacggccgggtcaacaggaaacctgggtgt
ccgggagccgctttggccaatgctggccctgaaggttatggctcctgggtcaacagggtactgacgccgt
gccgtaccgctattgtttcaggaccaggcgccgctacatccactggaagatcgccggaatgctacgga
tctgagcagcaaggacccgctggctcctggagctgccactgccgctgccgctggcaggggtcctgggtga
tacagatcaggtgagcaagggtccagaggacgtgggtgccgctgccgctactgtggctgggtattggacct
ggcggttacggtagcagacaggaaggacccggaggccctgttgccgctgccgatgcttccggcccagggt
ggatatagaccaggacagccggcggtcctgtggctaccgctgccacagctggccagggtccgagaggt
tacgtgcccggacaacaggggccctgtgggagctgccgctgccacttccagatcgggacctgggtggttat
gggtccgggcaacaaggacctggagctgcctccgctgcctcgggacctgggtggatacgggtccagaacaa
caaggacctgggtgctgccctcgtgccgctgccggatcaggctcctggcggttatgggtccaggacctcag
gctagtgtgccagatctagactggctttccagacagtagatcaagagtctcctcggtgcctcgaac
ttgggtggctagtgggtccgacaaattctgctgccctcagcaacgctatttccaatactgtgtcggaaata
ggagcttcataccaggactgtctggctgtgatgttctgggtccaagctttgatggaaattgttagcgcc
ctcgtcgtatactgagttcatctagcatcgacaggttaactacgtggccgtttctcaaagegctcag
gtgggttcccaatcgctgttgcaggctttgtactaattttaataataaaataaccctgttttcttactt
cgctcctggatacatctatgttttttttttcgttaataaatgagagcatttaagttattgtttttaatta
cttttttttagaaaacagatttcggattttttgtatgcattttatttgaatgtactaatataatcaatt
aatcaatgaattcattttatttaagggataacaataatccatgaattcacatgcacatttaaaacaaaac
taaattacaataggttcatataaaaacaacaagtatgccttctcaactaagaatactatactgcag。

[0048] SEQ ID NO: 3 : ATGAAACCTATCTTCCTCGT。

[0049] SEQ ID NO: 4 : TTATCCTAAAGCCTGGTAGA。

[0050] SEQ ID NO: 5: ATGAGAGTCAAAACCTTCGTG。

[0051] SEQ ID NO: 6: GCTTTGAGAAACGGCCACGTA。

[0052] SEQ ID NO: 7 : TATATTCGCGGCGTTGTGAC。

[0053] SEQ ID NO: 8: AAGTTGGGCATACGGGAAGA。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝，其特征在于，所述多种蜘蛛腺丝蛋白为两种及两种以上不同的蜘蛛腺丝蛋白。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝，其特征在于，所述蜘蛛腺丝蛋白为蜘蛛大壶状腺丝蛋白。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝，其特征在于，所述蜘蛛为金丝织网蜘蛛。
- [权利要求 4] 一种生产权利要求1所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的家蚕，其特征在于，将多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列克隆入质粒，再转化重组，然后转染培养细胞，得到重组病毒粒子；将所述重组病毒粒子接种家蚕幼虫，喂养至熟蚕，得到生产所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的家蚕。
- [权利要求 5] 权利要求1所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法，其特征在于，将多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列克隆入质粒，再转化重组，然后转染培养细胞，得到重组病毒粒子；将所述重组病毒粒子接种家蚕幼虫，喂养至熟蚕，然后上簇、采茧、缂丝，得到含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法，其特征在于，多种表达蜘蛛腺丝蛋白的序列为SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2。
- [权利要求 7] 根据权利要求5所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法，其特征在于，采用含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌转化，培养后挑取白色菌落，提取重组DNA；将转化得到的重组DNA转染草地夜蛾Sf9培养细胞，得到重组病毒粒子。
- [权利要求 8] 根据权利要求5所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法，其特征在于，采用含有抗生素的桑叶喂养接种后的家蚕一天，然后采用未处理桑叶喂养至熟蚕，再用蜕皮激素处理一次，然后上簇。
- [权利要求 9] 根据权利要求5所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝的制备方法，

其特征在于，家蚕的品种包括丝茧育实用家蚕品种、家蚕原种。

[权利要求 10] 权利要求1所述含多种蜘蛛腺丝蛋白的高强度蚕丝在制备丝制品中的应用。

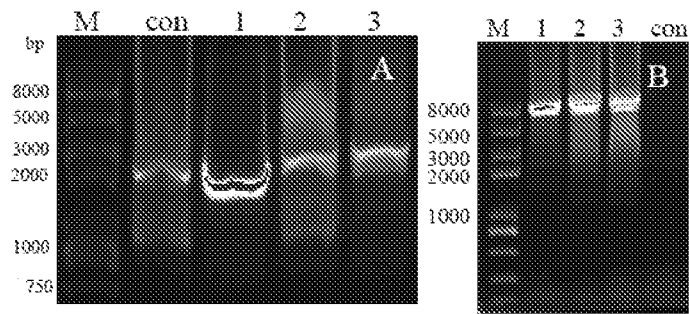


图 1

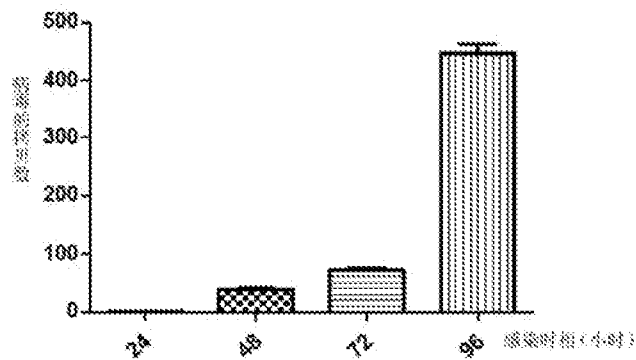


图 2

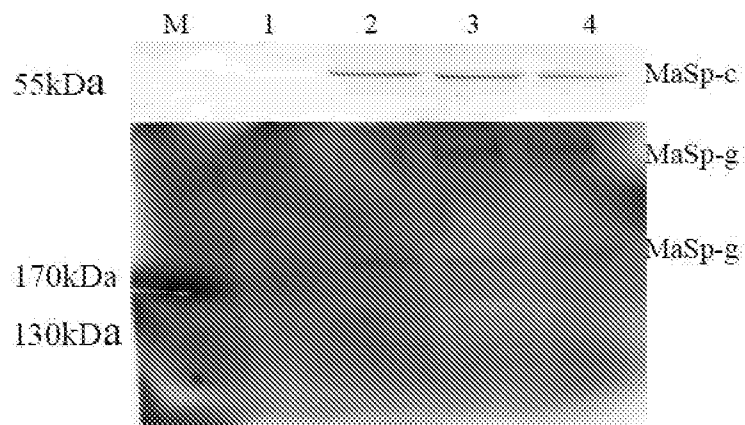


图 3

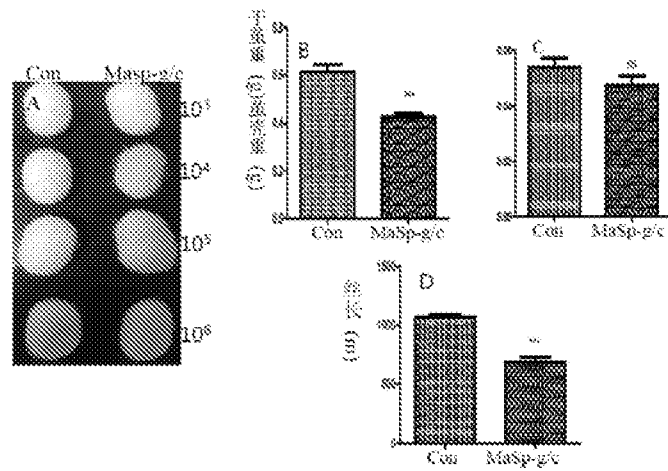


图 4

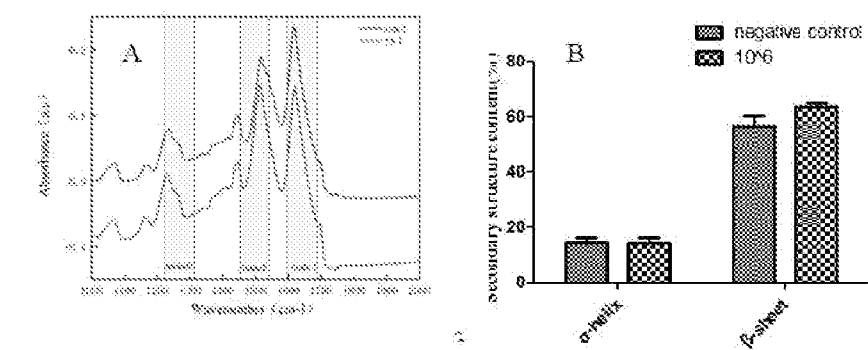


图 5

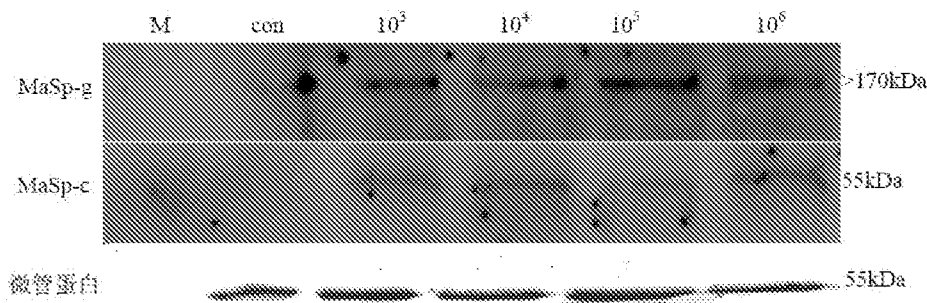


图 6

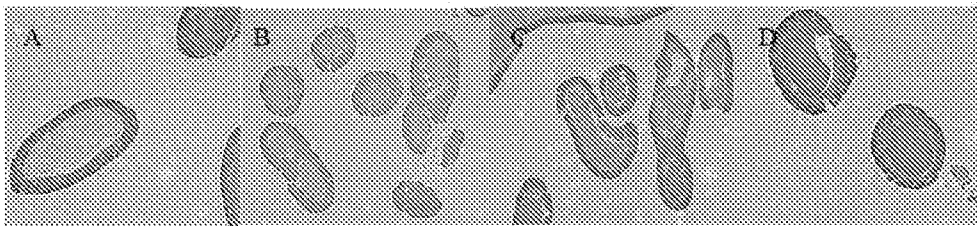


图 7

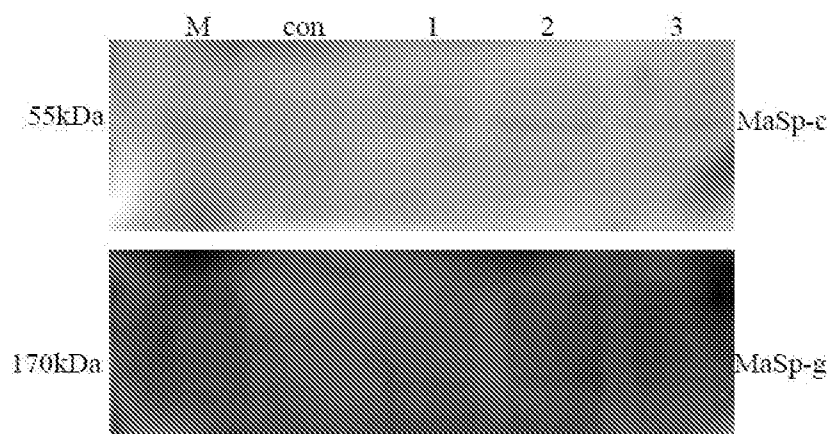


图 8

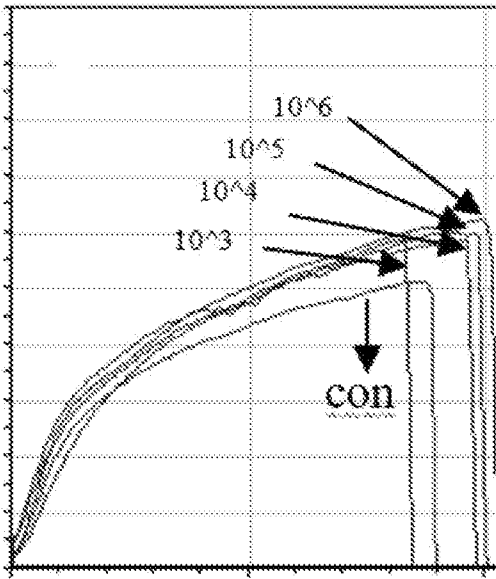


图 9

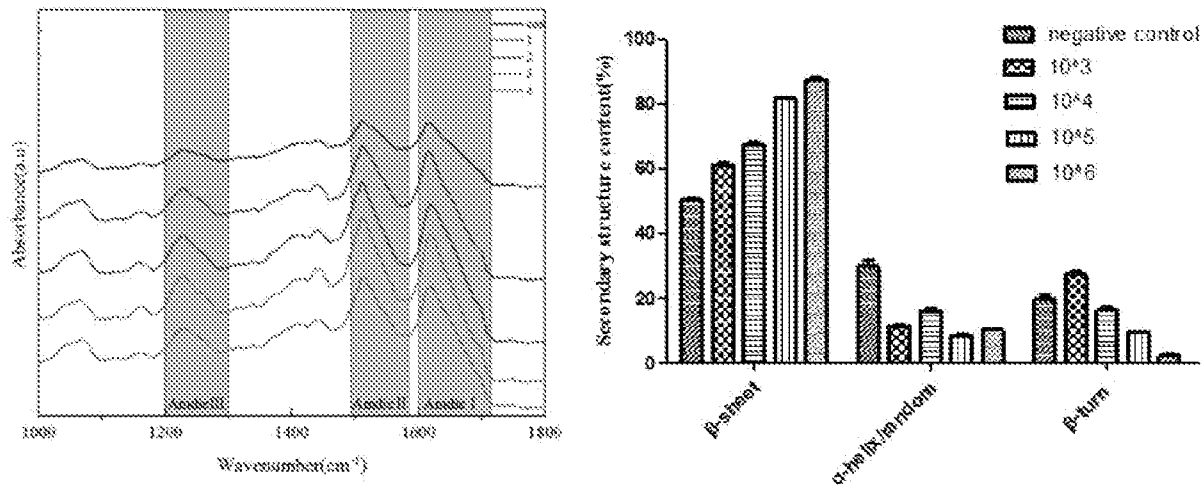


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00(2006.01)i;C12N15/866(2006.01)i;A01K67/033(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)

C07K, C12N, A01K

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)

CNABS; VEN; CNKI; NCBI; CNTXT; ENTXT; ISI web of science: 蜘蛛, 腺丝蛋白, 蚕丝, 金丝织网, 大壶状腺丝蛋白, 嵌合, 病毒, Trichonephila clavipes, major ampullate spidroin, MaSp, spider, gland silk protein?, silk?, chimeric, recombinant virus; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; EMBL和检索的序列, searched sequences: SEQ ID NOS: 1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114685687 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 01 July 2022 (2022-07-01) see claims 1-10, and embodiments 1-4	1-10
X	CN 103261231 A (THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME) 21 August 2013 (2013-08-21) see abstract, claims 1-23, and description, paragraphs 8-19	1-3, 10
Y	CN 103261231 A (THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME) 21 August 2013 (2013-08-21) see abstract, claims 1-23, and description, paragraphs 8-19	4-9
Y	CN 1786176 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 14 June 2006 (2006-06-14) see abstract, and claims 1-13	4-9
X	CN 111518832 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 11 August 2020 (2020-08-11) see abstract, and claims 1-9	1-3, 10
Y	CN 111518832 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 11 August 2020 (2020-08-11) see abstract, and claims 1-9	4-9



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

18 January 2023

Date of mailing of the international search report

08 February 2023

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105404**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110551190 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 December 2019 (2019-12-10) see abstract, and claims 1-10	1-3, 10
Y	CN 110551190 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 December 2019 (2019-12-10) see abstract, and claims 1-10	4-9
X	CN 111518831 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 11 August 2020 (2020-08-11) see abstract, and claims 1-9	1-3, 10
Y	CN 111518831 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 11 August 2020 (2020-08-11) see abstract, and claims 1-9	4-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105404

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/CN2022/105404

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114685687	A	01 July 2022	None			
CN	103261231	A	21 August 2013	US	2013212718	A1	15 August 2013
				JP	2019205463	A	05 December 2019
				AU	2017201493	A1	23 March 2017
				US	2019153047	A1	23 May 2019
				EP	2621957	A2	07 August 2013
				EP	2621957	A4	26 March 2014
				EP	2621957	B1	02 June 2021
				US	2019106467	A1	11 April 2019
				CA	2812791	A1	19 April 2012
				CA	2812791	C	14 July 2020
				US	2019185528	A1	20 June 2019
				US	2015322121	A1	12 November 2015
				AU	2019201497	A1	11 April 2019
				KR	20170023415	A	03 March 2017
				KR	101926286	B1	10 December 2018
				AU	2011314072	A1	23 May 2013
				AU	2011314072	B2	30 March 2017
				WO	2012050919	A2	19 April 2012
				WO	2012050919	A3	27 December 2012
				KR	20140095010	A	31 July 2014
				JP	2017127309	A	27 July 2017
				US	2015322122	A1	12 November 2015
				BR	112013007247	A2	14 June 2016
				JP	2014502140	A	30 January 2014
				KR	20180130603	A	07 December 2018
				KR	102063002	B1	07 January 2020
CN	1786176	A	14 June 2006	None			
CN	111518832	A	11 August 2020	None			
CN	110551190	A	10 December 2019	None			
CN	111518831	A	11 August 2020	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/105404

A. 主题的分类 C07K19/00(2006.01)i;C12N15/866(2006.01)i;A01K67/033(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) C07K, C12N, A01K 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)) CNABS; VEN; CNKI; NCBI; CNTXT; ENTXT; ISI web of science和关键词: 蜘蛛, 腺丝蛋白, 蚕丝, 金丝织网, 大壶状腺丝蛋白, 嵌合, 病毒, Trichonephila clavipes, major ampullate spidroin, MaSp, spider, gland silk protein?, silk?, chimeric, recombinant virus; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1、2																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 114685687 A (苏州大学) 2022年7月1日 (2022 - 07 - 01) 见权利要求1-10、实施例1-4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段</td> <td>1-3、10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段</td> <td>4-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1786176 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 见摘要、权利要求1-13</td> <td>4-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9</td> <td>1-3、10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9</td> <td>4-9</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 114685687 A (苏州大学) 2022年7月1日 (2022 - 07 - 01) 见权利要求1-10、实施例1-4	1-10	X	CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段	1-3、10	Y	CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段	4-9	Y	CN 1786176 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 见摘要、权利要求1-13	4-9	X	CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	1-3、10	Y	CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	4-9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 114685687 A (苏州大学) 2022年7月1日 (2022 - 07 - 01) 见权利要求1-10、实施例1-4	1-10																					
X	CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段	1-3、10																					
Y	CN 103261231 A (圣母大学) 2013年8月21日 (2013 - 08 - 21) 见摘要、权利要求1-23、说明书第8-19段	4-9																					
Y	CN 1786176 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 见摘要、权利要求1-13	4-9																					
X	CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	1-3、10																					
Y	CN 111518832 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	4-9																					
☒ 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 2023年1月18日		国际检索报告邮寄日期 2023年2月8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 传真号 (86-10)62019451		授权官员 王金凤 电话号码 (+86) 010-62412282																					

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
X	CN 110551190 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10) 见摘要、权利要求1-10	1-3、10
Y	CN 110551190 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10) 见摘要、权利要求1-10	4-9
X	CN 111518831 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	1-3、10
Y	CN 111518831 A (浙江大学) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 见摘要、权利要求1-9	4-9

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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/105404

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)
CN	114685687	A	2022年7月1日	无	
CN	103261231	A	2013年8月21日	US	2013212718 A1 2013年8月15日
				JP	2019205463 A 2019年12月5日
				AU	2017201493 A1 2017年3月23日
				US	2019153047 A1 2019年5月23日
				EP	2621957 A2 2013年8月7日
				EP	2621957 A4 2014年3月26日
				EP	2621957 B1 2021年6月2日
				US	2019106467 A1 2019年4月11日
				CA	2812791 A1 2012年4月19日
				CA	2812791 C 2020年7月14日
				US	2019185528 A1 2019年6月20日
				US	2015322121 A1 2015年11月12日
				AU	2019201497 A1 2019年4月11日
				KR	20170023415 A 2017年3月3日
				KR	101926286 B1 2018年12月10日
				AU	2011314072 A1 2013年5月23日
				AU	2011314072 B2 2017年3月30日
				WO	2012050919 A2 2012年4月19日
				WO	2012050919 A3 2012年12月27日
				KR	20140095010 A 2014年7月31日
				JP	2017127309 A 2017年7月27日
				US	2015322122 A1 2015年11月12日
				BR	112013007247 A2 2016年6月14日
				JP	2014502140 A 2014年1月30日
				KR	20180130603 A 2018年12月7日
				KR	102063002 B1 2020年1月7日
CN	1786176	A	2006年6月14日	无	
CN	111518832	A	2020年8月11日	无	
CN	110551190	A	2019年12月10日	无	
CN	111518831	A	2020年8月11日	无	