

(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
2012 年 11 月 29 日 (29.11.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/159522 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 7/01 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01) C12R 1/93 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2012/074722

(22) 国际申请日:

2012 年 4 月 26 日 (26.04.2012)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201110139528.3 2011 年 5 月 26 日 (26.05.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **中国农业科学院上海兽医研究所 (SHANGHAI VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, CAAS)** [—/CN]; 中国上海市闵行区紫月路 518 号, Shanghai 200241 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **李泽君 (LI, Zejun)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区紫月路 518 号, Shanghai 200241 (CN)。 **滕巧洪 (TENG, Qiaoyang)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区紫月路 518 号, Shanghai 200241 (CN)。

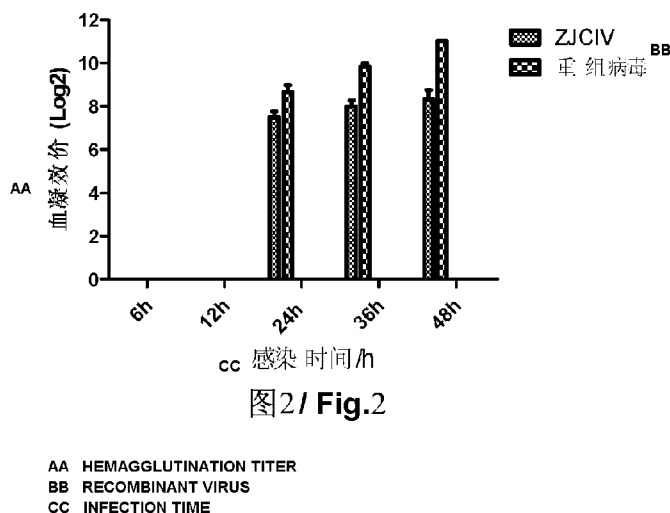
(74) 代理人: **上海大邦律师事务所 (DEBUND LAW OFFICES)**; 中国上海市静安区南京西路 819 号中创大厦 21 楼/周东萍, Shanghai 200041 (CN)。

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,

[见续页]

(54) Title: CANINE INFLUENZA RECOMBINANT VIRUS, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 犬流感重组病毒及其制备方法和应用



(57) Abstract: Disclosed is a canine influenza recombinant virus. The recombinant virus comprises HA and NA genes of ZJCIV canine influenza virus as well as six internal genes PA, PB1, PB2, M, NP and NS of a PR8 virus. Also disclosed is a preparation method for the canine influenza recombinant virus and an application of the canine influenza recombinant virus. The canine influenza recombinant virus in the present invention can generate very high virus titer and hemagglutination titer on a chicken embryo and an MDCK cell, and can be used as a good seed virus for developing canine influenza vaccines.

(57) 摘要: 本发明公开一种犬流感重组病毒, 该重组病毒包含: ZJCIV 犬流感病毒的 HA 和 NA 基因、以及 PR8 病毒的 PA、PB1、PB2、M、NP 和 NS 六个内部基因。本发明还公开了犬流感重组病毒的制备方法及应用。本发明的犬流感重组病毒, 在鸡胚和 MDCK 细胞上均能产生很高的病毒滴度和血凝滴度, 可作为研制犬流感疫苗的优良种毒。



WO 2012/159522 A1



TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW。

CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

- (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, SD, SL, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

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))。

说明书

发明名称：犬流感重组病毒及其制备方法和应用

[1] 技术领域

[2] 本发明涉及生物工程技术领域，尤其涉及一种犬流感重组病毒及其制备方法和应用。

[3] 背景技术

[4] A型流感病毒是一类威胁人类健康的重要传染病。流感病毒具有严格的宿主特异性，即便是相同病毒在不同的宿主上的传播也受到宿主界限制。早在2004年，美国首次报道H3N8亚型犬流感病毒引起犬流感的大爆发，通过序列分析，发现该亚型的犬流感病毒是从马流感病毒衍变而来的。随后，澳大利亚发生马流感后也爆发犬流感病毒。2008年，韩国爆发了由H3N2亚型犬流感病毒引起的犬流感，通过序列分析，发现H3N2亚型的犬流感病毒是禽源的，不同于欧美国家的马源犬流感病毒。

[5] 2006-2007年间，中国华南地区发病犬体内分离获得数株H3N2亚型犬流感病毒，通过序列分析，发现这些病毒与韩国分离到病毒高度同源。对华南地区宠物的血清进行调查发现，6.7%的狗血清呈流感阳性。2010年，本实验室从华东地区也分离获得一株犬流感病毒，命名为A/canine/Zhejiang/01/2010(H3N2亚型，简称ZJCIV)。对ZJCIV病毒的全基因组序列分析发现，该病毒与华南及韩国H3N2犬流感病毒高度同源。动物感染实验发现ZJCIV病毒可以感染狗，并可以引起犬发病，表现为食欲下降、高热、咳嗽和鼻腔中排出脓性分泌物等症状，解剖后发现肺淤血、出血，肺泡中充满炎性渗出物。

[6] 2009年6月，Intervet公司研究成功犬流感病毒灭活苗，在美国已经上市，但是中国流行的犬流感病毒与之前美国流行的犬流感病毒抗原性有差别，二者起源于不同的H3流感病毒分支。因而，研制针对H3N2亚型犬流感病毒流行株的疫苗，对于犬流感的预防控制具有重要的实际意义。

[7] 发明内容

[8] 本发明要解决的技术问题是提供一种犬流感重组病毒，其包含犬流感病毒ZJCI

V的HA和NA基因、以及PR8病毒的6个内部基因，该重组病毒能制成有效的针对H3N2亚型犬流感病毒的疫苗。

[9] 此外，还需要提供一种上述犬流感重组病毒的制备方法和应用。

[10] 为了解决上述技术问题，本发明通过如下技术方案实现：

[11] 在本发明的一个方面，提供了一种犬流感重组病毒，该重组病毒包含：ZJCIV犬流感病毒的HA和NA基因、以及PR8病毒的PA、PB1、PB2、M、NP和NS 六个内部基因，

[12] 所述犬流感病毒HA基因的核苷酸序列选自：

[13] (1)编码SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的核苷酸序列；

[14] (2)编码与SEQ ID NO.1所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列；

[15] 所述犬流感病毒NA基因的核苷酸序列选自：

[16] (1)编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列；

[17] (2)编码与SEQ ID NO.2所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[18] 优选的，所述犬流感病毒HA基因具有SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，或者所述犬流感病毒HA基因具有与SEQ ID NO.3所示核苷酸序列具有98%以上同源性的序列。

[19] 优选的，所述犬流感病毒NA基因具有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列，或者所述犬流感病毒NA基因具有与SEQ ID NO.4所示核苷酸序列具有98%以上同源性的序列。

[20] 在本发明中，与SEQ ID NO.1所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列，包括SEQ ID NO.1所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有ZJCIV犬流感病毒血凝素（HA）活性的氨基酸序列。

[21] 在本发明中，与SEQ ID NO.2所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列，包括SEQ ID NO.2所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有ZJCIV犬流感病毒神经氨酸酶（NA）活性的氨基酸序列。

[22] HA和NA是流感病毒的两个重要表面抗原，流感病毒的抗原变异主要就是指H

A和NA发生变异, 尤其HA变得更快。因此, 本发明犬流感重组病毒中包含的ZJCIV犬流感病毒的HA基因为编码SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的核苷酸序列, 或编码与SEQ ID NO.1所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列; 本发明犬流感重组病毒中包含的ZJCIV犬流感病毒的NA基因为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列, 或编码与SEQ ID NO.2所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[23] 在本发明的另一方面, 还提供了一种上述犬流感重组病毒的制备方法, 包括以下步骤:

[24] 构建分别包含ZJCIV犬流感病毒HA基因和NA基因的重组质粒;

[25] 将所述HA基因的重组质粒和NA基因的重组质粒, 与分别包含PR8病毒PA、PB1、PB2、M、NP、NS内部基因的六个质粒一起转染293T细胞, 培养转染后的细胞;

[26] 将培养的细胞上清接种于鸡胚, 在孵化器内培养合适时间后, 收获鸡胚尿囊液, 检测该尿囊液的血凝性, 如果有血凝活性, 并且经过序列分析确定没有非预期突变后, 即获得犬流感重组病毒。

[27] 优选的, 将培养的细胞上清接种于9-11日龄鸡胚, 在37°C孵化器内培养48-72小时后, 收获鸡胚尿囊液。

[28] 所述重组质粒采用PBD载体作为空载体。

[29] 在本发明的另一方面, 还提供了一种上述犬流感重组病毒在制备预防或治疗犬流感的病毒灭活疫苗中的应用。

[30] 在本发明的另一方面, 还提供了一种流感疫苗, 该疫苗以上述犬流感重组病毒为种毒而制成。

[31] 本发明犬流感重组病毒, 在鸡胚和MDCK细胞上均能产生很高的病毒滴度和血凝滴度, 可作为研制犬流感疫苗的优良种毒。

[32] 附图说明

[33] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[34] 图1是本发明实施例1犬流感病毒ZJCIV的HA和NA的RT-PCR电泳图;

[35] 图2是本发明实施例3救获的重组病毒和ZJCIV接种鸡胚后不同时间的血凝效价

图；

[36] 图3是本发明实施例3救获的重组病毒和ZJCIV在鸡胚上生长曲线比较图；

[37] 图4是本发明实施例3救获的重组病毒和ZJCIV接种MDCK细胞后不同时间的血凝效价图；

[38] 图5是本发明实施例3救获的重组病毒和ZJCIV在MDCK细胞上生长曲线比较图。

[39] 具体实施方式

[40] 下列实施例中，未注明具体条件的实验方法，通常按常规条件，如《精编分子生物学实验指南》(F. M. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼等主编, 马学军, 舒跃龙的译. 北京: 科学出版社, 2004)中所述的方法进行。

[41] 犬流感病毒疫苗研制的重要前提之一是有优良的种毒，本实验室之前分离到的A/canine/Zhejiang/01/2010病毒(H3N2亚型，简称ZJCIV)无论在鸡胚上还是在细胞上扩增后，血凝滴度均非常低。为此，本发明将ZJCIV犬流感病毒主要的抗原蛋白HA、NA基因与PR8病毒其余六个内部基因重组在一起，通过流感病毒的反向遗传操作系统救获一株在鸡胚和细胞均能产生很高的病毒滴度和血凝滴度的犬流感重组病毒，该重组病毒可作为研制犬流感疫苗的优良种毒。

[42] 实施例1 重组质粒的构建与鉴定

[43] 1、PCR扩增

[44] 用Trizol (Invitrogen)抽提犬流感病毒ZJCIV的总RNA。采用Reverse Transcription System

kit反转录试剂盒(TakaRa)，根据其说明书，用12bp引物5'-AGCAAAAGCAGG-3'为特异性引物，合成cDNA第一链。以获得的cDNA的第一链为模板，用sapI-HA-up、sapI-HA-down和sapI-NA-up、sapI-NA-down为上下游引物(含有BspQI酶切位点，如表1)，分别扩增出片段ZJCIV的HA和NA。PCR扩增程序为94℃预变性5 min，进入以下循环，94℃变性45s，53℃退火45s，72℃延伸1min45s，运行30个循环，最后再72℃延伸10min。同时设无模板的阴性对照。反应结束后，PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上进行电泳实验。结果如图1所示，有两条PCR的条带出现，大小分别约为1700 bp的HA和1400

bp的NA，目的片段大小相符。在图1中，M: DNA分子量标准；1: ZJCIV HA PCR产物；2: ZJCIV NA PCR产物。

[45] 表1 A型流感病毒 HA和NA基因的通用引物

[46] [Table 1]

引物名称	引物序列
sapI-HA-up	CACACAgtcttctattAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO.5)
sapI-HA-down	CACACAgtcttcggccAGTAGAAACAAGGG TGTTTT (SEQ ID NO.6)
sapI-NA-up	CACACAgtcttctattAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO.7)
sapI-NA-down	CACACAgtcttcggccAGTAGAAACAAGGA GTTTTT (SEQ ID NO.8)

[47] 2、PCR产物的割胶回收

[48] 电泳结束后在紫外光下从凝胶上切下目的DNA片段的琼脂糖凝胶，用DNA快速回收试剂盒回收DNA。具体方法如下：在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎，放入一无菌的1.5ml的EP管中，加入3倍凝胶体积（100mg=100ul体积）的Buffer DE-A（凝胶液），混合均匀后于75℃加热，间断混合（2-3min），直至凝胶块完全熔化（约6-8min）。加入0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B（结合液），混合均匀；当回收的DNA片段小于400bp时，加入1个凝胶体积的异丙醇。将混合液转移到DNA制备管中，12000×g 离心1min，倒掉收集管中的废液。将制备管置回收集管中，加入500ul Buffer W1（洗涤液），12000×g 离心30s，倒掉收集管中的废液。将制备管置回收集管中，加入700ul Buffer W2（去盐液），12000×g 离心1min，倒掉收集管中的废液，以同样的方法再洗一次。将制备管置回收集管中，12000×g 空离1min。最后将制备管置于洁净的1.5ml EP管中，在制备膜中央加入30ul的去离子水，室温静置1min，12000×g 离心1min

洗脱DNA，置于-20℃保存备用。

[49] 3、酶切、连接及转化

[50] 纯化的PCR产物和PBD载体（本实验室保存）在BspQI限制性内切酶（NEB）的作用下，按照说明书，在50℃温育1个小时。用胶回收试剂盒回收目的片段与PBD质粒的酶切产物，加入1ul的T4连接酶的缓冲液和1ul T4连接酶(TakaRa)，连接的反应体系为10ul，混匀。16℃过夜连接。连接产物转化于感受态细胞JM109（本实验室制备），并在无菌条件下超净台中涂布于含Amp的LB固体培养基上，37℃培养8-20h。

[51] 4、重组质粒的鉴定

[52] 挑取LB固体培养基上的单个菌落，放入加有约3ml含Amp的LB液体培养基的试管中，然后固定在摇床上37℃振荡培养10h或过夜。将菌液用碱性抽提法抽提的质粒，用PCR方法进行验证。鉴定为阳性的质粒进行序列测定，用DNASTAR序列分析软件比对。结果发现，重组质粒PBD-ZJCIVHA和PBD-ZJCIVNA构建成功，HA基因序列如SEQ ID NO. 3所示，NA基因序列如SEQ ID NO.4所示。

[53] 实施例2 重组PR8病毒的拯救

[54] 1、转染质粒准备

[55] 用超纯质粒抽提试剂盒（OMEGA）抽提质粒，操作步骤如下：1）用接种环蘸取保存甘油菌(含质粒PBD-ZJCIVHA、PBD-ZJCIVNA、PBD-PR8M、PBD-PR8PB1、PBD-PR8PB2、PBD-PR8PA、PBD-PR8NS、PBD-PR8NP，后六个质粒为本实验室保存)，在含Amp LB平板表面划线，37℃静置过夜；2）挑取单菌落，接种到5ml Amp LB培养基中，37℃振荡培养至OD600值为1.0-1.5；3）收集3ml过夜培养物，离心彻底去除培养基；4）悬浮菌体：用0.25ml含RNase A的溶液Solution I悬浮菌体，直至成匀浆状；5）裂解细菌：再加入0.25ml溶液Solution II，颠倒5次以轻轻混匀；6）中和：加入0.125ml 溶液Buffer N3，立刻颠倒5次以轻轻混匀，直至形成白色絮状沉淀，室温12,000×g，离心10min；7）小心将上清倒入干净的1.5ml离心管中，加入0.1倍体积的ETR Solution(蓝色)至上清液中，颠倒7-10次，然后冰浴10min；8)加入42℃水浴5min，再次混浊，室温12,000×g，离心3 min，ETR溶液将在离心管底部形成一个蓝色分层；9)上清移入

到新的1.5ml离心管中，加0.5倍体积的无水乙醇，颠倒6-7次，室温放置1-2min；10)上述混合液倒入一个事先用2ml 溶液E4平衡好的HiBand DNAMini柱，放在一个2ml的收集管上，室温10,000×g，离心1min，使裂解液流过柱子；11)弃去收集管中的液体，将剩余的混合液加入到柱子中，室温10,000×g，离心1min，使裂解液完全通过柱子；加入500ul Buffer HB到柱子上，室温下10,000离心1min，洗涤柱子，确保除去残余的蛋白质，以得到高质量的DNA；12)弃液体，用700ul DNA Wash

buffer洗涤柱子，室温下10,000×g，离心1min，弃去液体；13)重复，再加DNA Wash buffer；14)弃液体，空转，室温12,000×g离心2min，去液体；15)把柱子置于一个干净的1.5ml离心管中，加入30-50ul的无内毒素洗脱液到柱子上，室温静置2min，室温12,000×g离心1min以洗脱DNA，可洗两次；16)电泳检测，并用Nanodrop 2000c 紫外可见光分光光度计测量OD260、OD280，估算DNA含量与纯度。结果：获得了足量的转染所需质粒。

[56] 2、转染293T细胞

[57] 将上述超纯度抽提的质粒，包括PBD-ZJCIVHA、PBD-ZJCIVNA、PBD-PR8M、PBD-PR8PB1、PBD-PR8PB2、PBD-PR8PA、PBD-PR8NS和PBD-PR8NP，通过适量的脂质体2000共转染于3.5cm直径的293T细胞中。转染后6h，弃去细胞上清，加入2ml OPTI-MEM (Invitrogen)培养液，并放于37°C的CO2培养箱中培养72h。

[58] 3、拯救获得重组的PR8病毒

[59] 转染48h后的细胞上清，接种于9-11日龄SPF鸡胚(北京梅里亚维通实验动物技术有限公司)，用石蜡封口后置于37°C孵化器内培养。48-72h放入4°C过夜，取出，收获鸡胚尿囊液。尿囊液用血凝试验测定有无凝集活性。结果：尿囊液能使红细胞凝集，表明已成功拯救出一株含ZJCIV HA和NA基因的PR8重组病毒。

[60] 4、重组病毒的鉴定

[61] 用Trizol抽提重组病毒的尿囊液总RNA，并用12bp引物反转录，获得cDNA第一链。以cDNA第一链为模板，用sapI-HA-up、sapI-HA-down和sapI-NA-up、sapI-NA-down为上下游引物，PCR扩增ZJCIV HA和NA片段，并用1%琼脂糖电泳鉴定

。此外，将ZJCIV HA和ZJCIV NA PCR产物送公司测序。结果：在琼脂糖电泳胶上出现两条条带，大小分别约为1700 bp 和1400 bp，与目的大小完全一致。测序结果也进一步证实PCR产物确实为ZJCIV HA和NA片段。

[62] 实施例3 救获的重组病毒生长特性鉴定

[63] 1、救获的重组病毒和ZJCIV的EID50测定

[64] 含病毒的鸡胚尿囊液按照10倍倍比稀释，将 10^{-6} ~ 10^{-10} 各稀释度分别接种到5枚9-11日龄的SPF鸡胚中，37°C继续孵化48h。通过测定感染胚尿囊液的血凝活性来判断其是否感染，利用Reed-Muench法计算EID50（鸡胚半数感染量）。结果：救获的重组病毒和ZJCIV的EID50分别为107.5/100ul 和106.5/100ul。

[65] 2、救获的重组病毒和ZJCIV的TCID50测定

[66] 从 $1:10^{-3}$ 开始10倍稀释，把不同稀释度的重组病毒和ZJCIV接毒于长满单层MDCK细胞的48孔板中，接毒的过程：先用PBS清洗MDCK细胞两遍，然后在每一孔加入100ul病毒，每个稀释度做3个重复，把48孔板放入37°C CO₂培养箱让病毒吸附到细胞上，其中每过20min左右摇晃一次细胞，1.5h-2h后把细胞培养板中的病毒弃掉，用PBS清洗细胞两次，然后加入无血清培养基300ul。吸附了病毒的细胞在CO₂培养箱继续培养72h，然后测定每一个孔的血凝活性，利用Reed-Muench法计算TCID50（组织细胞半数感染量）。结果：救获的重组病毒和ZJCIV的TCID50分别为106.5/100ul 和105.5/100ul。

[67] 3、救获的重组病毒和ZJCIV在鸡胚上生长特性比较

[68] 救获的重组病毒和ZJCIV 稀释为100EID50，按照这个稀释度分别接种18枚9-11日龄的SPF鸡胚。在接毒后6h，12h，24h，36h，48h，72h时，分别取出3枚接种过的SPF鸡胚，收集其尿囊液并测定它们的血凝效价(图2)。把收集的各个时间段的尿囊液，按10倍稀释，每个稀释度的病毒液接种3枚9-11日龄的SPF鸡胚，接毒量为100ul/枚。接毒后48h测定鸡胚尿囊液的血凝活性，计算不同时间收集尿囊液的病毒含量，并绘制病毒的生长曲线（图3），比较救获的重组病毒和ZJCIV在鸡胚上的生长情况。结果如图2所示，接毒后12h内，ZJCIV和重组病毒的尿囊液均无血凝性。接毒后48h，重组病毒的血凝效价达到211，明显高于ZJCIV的血凝效价。如图3所示结果，ZJCIV和救获的重组病毒在接毒6h时，均未能检测

到病毒。接毒12h后，救获的重组病毒病毒滴度明显高于ZJCIV，并于接毒48h后达到最高峰。

[69] 4、救获的重组病毒和ZJCIV在MDCK细胞上生长特性的比较

[70] 救获的重组病毒和ZJCIV

稀释为100TCID₅₀，按照这个稀释度各接种3瓶MDCK细胞长至80%的T25细胞瓶。在接毒后6h，12h，24h，36h，48h，72h时，分别收集其细胞上清并测定它们的血凝效价(图4)。滴定各个时间收集的细胞上清中的病毒含量，具体如下：把收集的细胞上清按10倍稀释，每个稀释度的病毒液接种3孔在24孔细胞板上长至80%的MDCK细胞，接毒后48h测定血凝活性，计算各个时间收集的细胞上清中的病毒含量(TCID₅₀)，根据此TCID₅₀绘出病毒的生长曲线(图5)，比较救获的重组病毒和ZJCIV在MDCK细胞上的生长情况。血凝效价的结果如图4所示，接毒后12h内，ZJCIV的细胞上清无血凝活性，而重组病毒的细胞上清有血凝活性，并在接毒后36h达到高峰，随后趋于相对稳定。在整个感染过程中，重组病毒血凝活性明显高于ZJCIV的血凝活性。病毒滴度的结果如图5所示，ZJCIV和救获的重组病毒在接毒6h时，未能检测到病毒，接毒后12h，救获的重组病毒就可以检测到，而ZJCIV直到接毒后24h才能检测到。接毒后36h，重组病毒和ZJCIV的病毒滴度达到高峰，随后便开始下降。在整个细胞感染过程中，重组病毒的病毒滴度明显高于ZJCIV的病毒滴度。

[71] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

- [权利要求 1] 1.一种犬流感重组病毒，其特征在于，该重组病毒包含：ZJCIV犬流感病毒的HA和NA基因、以及PR8病毒的PA、PB1、PB2、M、NP和NS 六个内部基因，
所述犬流感病毒HA基因的核苷酸序列选自：
(1)编码SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的核苷酸序列；
(2)编码与SEQ ID NO.1所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列；
所述犬流感病毒NA基因的核苷酸序列选自：
(1)编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核苷酸序列；
(2)编码与SEQ ID NO.2所示氨基酸序列具有98%以上同源性的氨基酸序列的核苷酸序列。
- [权利要求 2] 2.根据权利要求1所述的犬流感重组病毒，其特征在于，所述犬流感病毒HA基因具有SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列，或者所述犬流感病毒HA基因具有与SEQ ID NO.3所示核苷酸序列具有98%以上同源性的序列。
- [权利要求 3] 3.根据权利要求1所述的犬流感重组病毒，其特征在于，所述犬流感病毒NA基因具有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列，或者所述犬流感病毒NA基因具有与SEQ ID NO.4所示核苷酸序列具有98%以上同源性的序列。
- [权利要求 4] 4.一种权利要求1所述犬流感重组病毒的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
构建分别包含ZJCIV犬流感病毒HA基因和NA基因的重组质粒；
将所述HA基因的重组质粒和NA基因的重组质粒，与分别包含PR8病毒PA、PB1、PB2、M、NP、NS内部基因的六个质粒一起转染293T细胞，培养转染后的细胞；
将培养的细胞上清接种于鸡胚，在孵化器内培养合适时间后，收获鸡胚尿囊液，检测该尿囊液的血凝性，如果有血凝活性，并且

经过序列分析确定没有非预期突变后，即获得犬流感重组病毒。

[权利要求 5] 5.根据权利要求4所述的制备方法，其特征在于，所述重组质粒采用PBD载体作为空载体。

[权利要求 6] 6.根据权利要求4所述的制备方法，其特征在于，将培养的细胞上清接种于9-11日龄鸡胚，在37℃孵化器内培养48-72小时后，收获鸡胚尿囊液。

[权利要求 7] 7.权利要求1所述犬流感重组病毒在制备预防或治疗犬流感的病毒灭活疫苗中的应用。

[权利要求 8] 8.一种流感疫苗，其特征在于，以权利要求1所述犬流感重组病毒为种毒而制成。

1/3

说明书附图

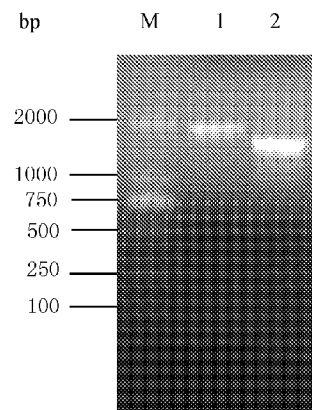


图 1

说明书附图

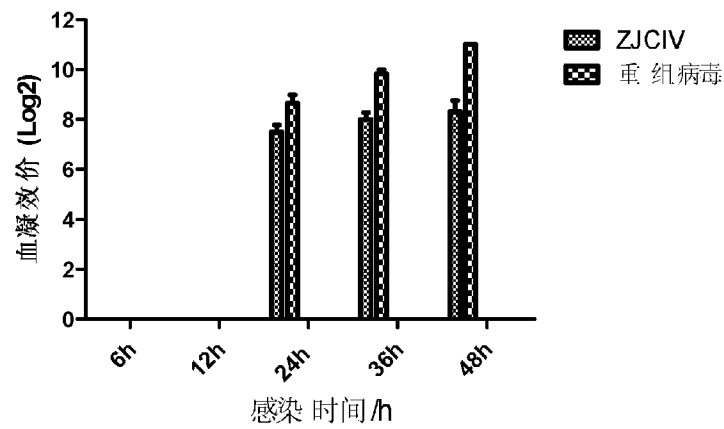


图 2

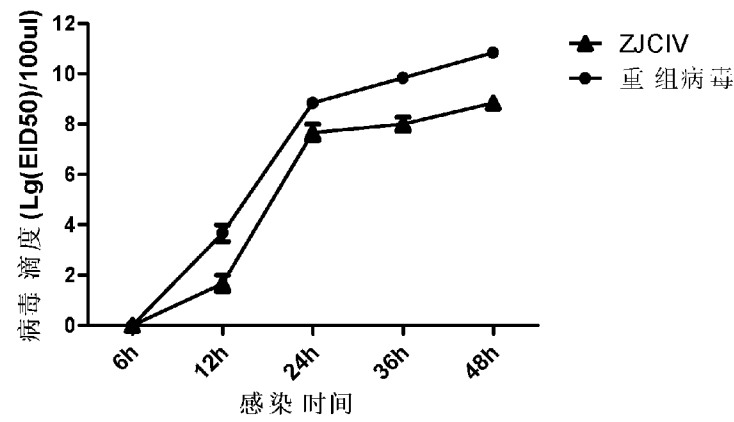


图 3

3/3

说明书附图

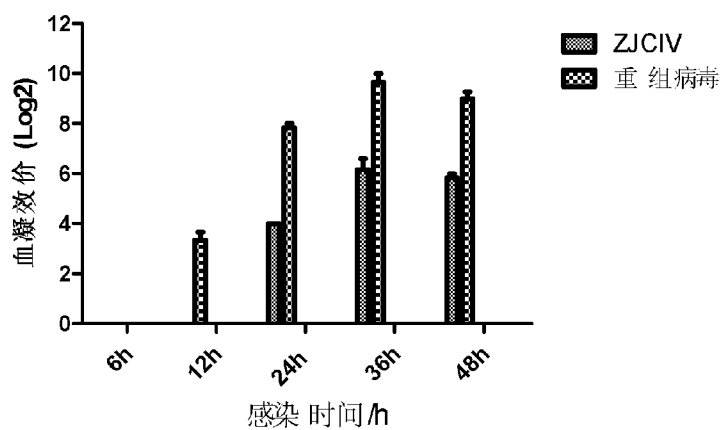


图 4

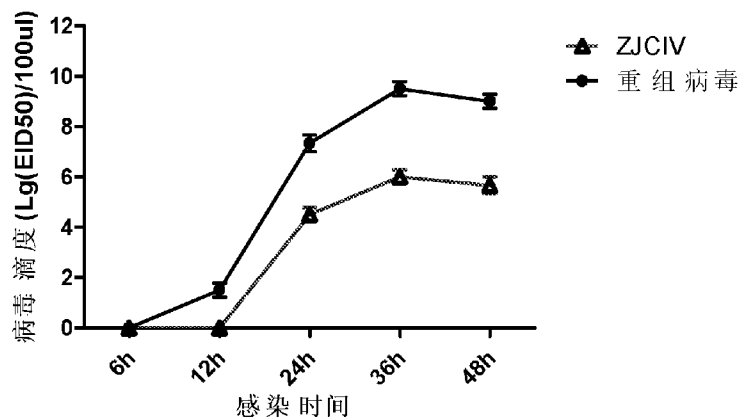


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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: C07K; C12N; A61K; A61P

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)

CNKI; CNPAT and search terms: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, influenza, virus, hemagglutinin, neuraminidase, etc.

DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; CA; ELSEVIER; EMBASE and search terms: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, canine, influenza, hemagglutinin, neuraminidase, etc.

GENBANK; EMBL; STN; National Bio-sequence Database of Chinese Patent and searched sequence: sequences 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1624116 A (HARBIN VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 08 June 2005 (08.06.2005), claims 1-3, and description, page 2, paragraph 5, and pages 5-6	1-8
Y	CN 101605898 A (BIONOTE, INC.), 16 December 2009 (16.12.2009), abstract, claims 1-21, and description, page 5, paragraphs 3-5, page 7, paragraphs 2-8, and page 8, paragraphs 4-8, SEQ ID NO: 9-10 and SEQ ID NO: 11-12	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 16 July 2012 (16.07.2012)	Date of mailing of the international search report 09 August 2012 (09.08.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer YUE, Lixi Telephone No.: (86-10) 62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GenBank registry number GU433356, 23 September 2010 (23.09.2010), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855729 > the whole document	1-8
Y	GenBank registry number GU433353, 23 September 2010 (23.09.2010), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855721 > the whole document	1-8
Y	GenBank registry number CY090035, 04 May 2011 (04.05.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/332078622 > the whole document	1-8
P, X	CN 102220293 A (SHANGHAI VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, THE CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 19 October 2011 (19.10.2011), claims 1-8, and description, pages 2-3	1-8
P, Y	LIN, Y., et al. Genetic and pathobiologic characterization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu Province of China in 2009-2010. VETERINARY MICROBIOLOGY, 17 February 2012 (17.02.2012), vol. 158, no. 3-4, pages 247-258, abstract, and figures 1-2	1-8
P, Y	GenBank registry number JN247595, 31 July 2011 (31.07.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612473 > the whole document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	GenBank registry number JN247581, 31 July 2011 (31.07.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612441 > the whole document	1-8
A	CN 1350578 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 22 May 2002 (22.05.2002), the whole document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/074722

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1624116 A	08.06.2005	CN 1261564 C	28.06.2006
CN 101605898 A	16.12.2009	KR 100850545 B1	05.08.2008
		WO 2009057843 A1	07.05.2009
		EP 2078083 A1	15.07.2009
		US 2010285063 A1	11.11.2010
		JP 2011501950 A	20.01.2011
		EP 2078083 B1	25.04.2012
		CN 101605898 B	23.05.2012
CN 102220293 A	19.10.2011	None	
CN 1350578 A	22.05.2002	WO 0060050 A2	12.10.2000
		AU 4073300 A	23.10.2000
		BR 0009580 A	02.01.2002
		EP 1185615 A2	13.03.2002
		KR 20010113044 A	24.12.2001
		US 2003035814 A1	20.02.2003
		JP 2003528570 A	30.09.2003
		MXPA 01010082 A	01.05.2002
		AU 2005202386 A1	23.06.2005
		US 2006057116 A1	16.03.2006
		US 2006134138 A1	22.06.2006
		EP 1185615 B1	01.08.2007
		EP 1820853 A2	22.08.2007
		DE 60035778 E	13.09.2007
		EP 1820853 A3	03.10.2007
		ES 2290024 T3	16.02.2008
		AU 2005202386 B2	03.01.2008
		DE 60035778 T2	30.04.2008
		KR 100702275 B1	30.03.2007
		AU 2008201521 A1	01.05.2008
		AU 2005202386 B9	10.07.2008
		MX 249328 B	24.09.2007
		US 2009246830 A1	01.10.2009
		IL 145702 A	15.04.2010
		CN 1350578 B	12.05.2010
		CN 101851636 A	06.10.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/074722

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2011143424 A1	16.06.2011
		EP 2345716 A1	20.07.2011
		EP 1820853 B1	21.09.2011
		JP 2011182797 A	22.09.2011
		MX 288647 B	25.07.2011
		WO 0060050 A3	18.01.2001
		HK 1148778 A0	16.09.2011
		ES 2373405 T3	03.02.2012
		AU 2008201521 B2	02.02.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074722

CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/01 (2006.01) i

C07K 14/11 (2006.01) i

C12N 15/44 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/145 (2006.01) i

A61P 31/16 (2006.01) i

C12R 1/93 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/074722

A. 主题的分类

参见附加页

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: C07K; C12N; A61K; A61P

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))

CNKI; CNPAT 和检索词: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, 流感, 病毒, 血凝素, 神经氨酸酶等;

DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; CA; ELSEVIER; EMBASE 和检索词: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, canine, influenza, hemagglutinin, neuraminidase 等;

GENBANK; EMBL; STN; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 序列 1-4

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	CN 1624116 A (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 08.6月2005 (08.06.2005) 权利要求 1-3、说明书第 2 页第 5 段、第 5-6 页	1-8
Y	CN 101605898 A (韩国安捷公司) 16.12月2009 (16.12.2009) 摘要、权利要求 1-21、说明书第 5 页第 3-5 段、第 7 页第 2-8 段、 第 8 页第 4-8 段、SEQ ID NO: 9-10、SEQ ID NO: 11-12	1-8

☒ 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

“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

16.7月2012 (16.07.2012)

国际检索报告邮寄日期

09.8月2012 (09.08.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

岳礼溪

电话号码: (86-10) **62411096**

C(续). 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	GenBank 登录号 GU433356, 23. 9 月 2010 (23.09.2010) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855729> 全文	1-8
Y	GenBank 登录号 GU433353, 23. 9 月 2010 (23.09.2010) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855721> 全文	1-8
Y	GenBank 登录号 CY090035, 04. 5 月 2011 (04.05.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/332078622> 全文	1-8
P, X	CN 102220293 A (中国农业科学院上海兽医研究所) 19. 10 月 2011 (19.10.2011) 权利要求 1-8、说明书第 2-3 页	1-8
P, Y	LIN, Y.,等. Genetic and pathobiologic characterization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu Province of China in 2009–2010. Veterinary Microbiology, 17. 2 月 2012 (17.02.2012), 第 158 卷, 第 3-4 期, 第 247-258 页 摘要、图 1-2	1-8
P, Y	GenBank 登录号 JN247595, 31. 7 月 2011 (31.07.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612473> 全文	1-8

C(续). 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
P, Y	GenBank 登录号 JN247581, 31. 7 月 2011 (31.07.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612441 > 全文	1-8
A	CN 1350578 A (威斯康星校友研究基金会) 22. 5 月 2002 (22.05.2002) 全文	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/074722

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1624116 A	08. 06.2005	CN1261564 C	28. 06.2006
CN101605898 A	16. 12.2009	KR100850545 B1	05. 08.2008
		WO2009057843 A1	07. 05.2009
		EP2078083 A1	15. 07.2009
		US2010285063 A1	11. 11.2010
		JP2011501950 A	20. 01.2011
		EP2078083 B1	25. 04.2012
		CN101605898 B	23. 05.2012
CN102220293 A	19. 10.2011	无	
CN1350578 A	22. 05.2002	WO0060050 A2	12. 10.2000
		AU4073300 A	23. 10.2000
		BR0009580 A	02. 01.2002
		EP1185615 A2	13. 03.2002
		KR20010113044 A	24. 12.2001
		US2003035814 A1	20. 02.2003
		JP2003528570 A	30. 09.2003
		MXPA01010082 A	01. 05.2002
		AU2005202386 A1	23. 06.2005
		US2006057116 A1	16. 03.2006
		US2006134138 A1	22. 06.2006
		EP1185615 B1	01. 08.2007
		EP1820853 A2	22. 08.2007
		DE60035778 E	13. 09.2007
		EP1820853 A3	03. 10.2007
		ES2290024 T3	16. 02.2008
		AU2005202386 B2	03. 01.2008
		DE60035778 T2	30. 04.2008
		KR100702275 B1	30. 03.2007
		AU2008201521 A1	01. 05.2008
		AU2005202386 B9	10. 07.2008
		MX249328 B	24. 09.2007
		US2009246830 A1	01. 10.2009
		IL145702 A	15. 04.2010
		CN1350578 B	12. 05.2010
		CN101851636 A	06. 10.2010

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/074722

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US2011143424 A1	16. 06.2011
		EP2345716 A1	20. 07.2011
		EP1820853 B1	21. 09.2011
		JP2011182797 A	22. 09.2011
		MX288647 B	25. 07.2011
		WO0060050 A3	18. 01.2001
		HK1148778 A0	16. 09.2011
		ES2373405 T3	03. 02.2012
		AU2008201521 B2	02. 02.2012

续: A. 主题的分类

C12N 7/01 (2006.01) i

C07K 14/11 (2006.01) i

C12N 15/44 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/145 (2006.01) i

A61P 31/16 (2006.01) i

C12R 1/93 (2006.01) i