

(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
2021 年 5 月 27 日 (27.05.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/098684 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/863 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/129494

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 17 日 (17.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911157697.2 2019 年 11 月 22 日 (22.11.2019) CN

(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, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 姜璐(JIANG, Lu); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 路中华(LU, Zhonghua); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 刘太安(LIU, Taian); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 陈晔菲(CHEN, Yefei); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 纪文静(JI, Wenjing); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 柏艳阳(BAI, Yanyang); 中国广

(54) **Title:** RECOMBINANT PSEUDORABIES VIRUS EXPRESSING E2-CRIMSON, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种表达E2-crimson的重组伪狂犬病毒及其制备方法和应用

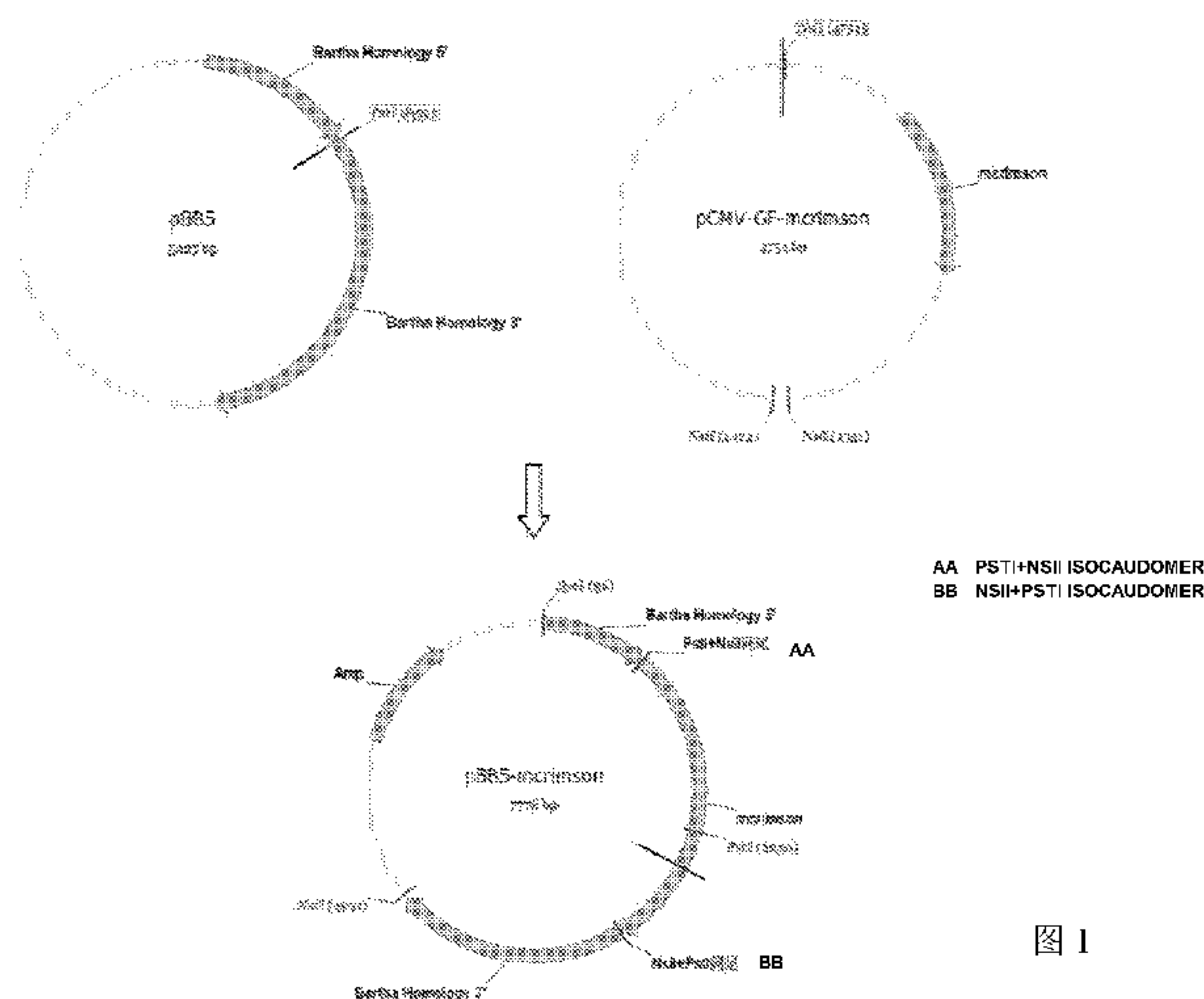


图 1

(57) **Abstract:** A recombinant pseudorabies virus expressing E2-crimson, a preparation method therefor and an application thereof. A recombinant vector of the recombinant pseudorabies virus expressing E2-crimson is a pBB5-E2-crimson vector comprising the E2-crimson gene. The red fluorescent protein E2-crimson used in the recombinant pseudorabies virus has high fluorescence intensity, fast maturation time, strong transmission capabilities, and no cytotoxicity to bacteria and mammalian cells. The prepared recombinant pseudorabies virus can efficiently reversely label neural circuits in mouse striatum, has high expression efficiency and strong infectivity, and has broad application prospects in the field of neural circuit tracing.

(57) **摘要:** 一种表达E2-crimson的重组伪狂犬病毒及其制备方法和应用, 所述表达E2-crimson的重组伪狂犬病毒的重组载体为包括E2-crimson基因的pBB5-E2-crimson载体。重组伪狂犬病毒中采用的红色荧光蛋白E2-crimson荧光强度高、成熟时间快、透射能力强, 对细菌和哺乳动物细胞无细胞毒性, 制备的重组伪狂犬病毒在小鼠纹状体中可以高效地逆向标记神经环路, 表达效率高, 侵染能力强, 在神经环路示踪领域具有广泛的应用前景。

东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道
1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司
(BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市
海淀区杏石口路 50 号中间建筑 1 区 148
号, Beijing 100195 (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,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
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, 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, 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))。

一种表达 E2-crimson 的重组伪狂犬病毒及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于神经工程技术领域，涉及一种表达 E2-crimson 的重组伪狂犬病毒及其制备方法和应用。

背景技术

神经系统是由数目众多的神经元相互连接而构成的复杂神经网络。揭示各个功能神经元之间的连接方式是神经科学研究领域的基本问题，对于理解大脑正常功能和神经系统疾病的病理机制具有十分重要的意义。以描绘神经元连接方式为目的的神经环路示踪技术是目前脑科学研究的关键，位列美国脑计划九个优先资助项目的第二名，也是欧洲脑计划实施的基础和韩国脑计划的核心。

现有的神经环路示踪剂包括荧光染料、生物素和嗜神经病毒等。其中，以荧光染料和生物素为代表的传统示踪剂在神经组织中的扩散没有严格的突触特异性，应用于示踪神经突触连接具有很大的局限性。

嗜神经病毒由于其能够感染神经元并沿神经突触传递，在神经环路示踪中得到了广泛的应用。与传统的示踪剂相比，嗜神经病毒具有可携带外源基因、能够自我复制进行信号扩大、跨突触传播等特性，是目前最常用的神经环路示踪剂。现常用的神经网络示踪病毒包括单纯疱疹病毒、狂犬病毒和水泡口炎病毒等。其中，隶属于单纯疱疹病毒家族的伪狂犬病毒 PRV 由于其逆向跨突触传播、可携带大片段外源基因和生物安全性高等特点，是当前最具开发潜力的神经示踪工具病毒之一。野生型 PRV-Becker 株可以沿突触双向示踪，改造后的减毒株 PRV-Bartha 只能逆向跨突触传递，应用于神经环路示踪中的大多数病毒是在减毒株 PRV-Bartha 基础上改造的重组 PRV，因此只能进行逆向传递标记。

目前，已有多种表达绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白的重组 PRV 病毒，例如表达绿色荧光蛋白 EGFP 的 PRV152，表达红色荧光蛋白 DsRed 的 PRV600 和 PRV613、以及表达红色荧光蛋白 mRFP 的 PRV614。DsRed 是第一个被发现的红色荧光蛋白，克隆自 *Discosoma* 珊瑚，后续发展了一系列单体红色荧光蛋白 mRFP。目前常用的携带红色荧光蛋白基因的 PRV 为 PRV614，通常将其单独或者与其他颜色 PRV 共同注射到小鼠的特定脑区，研究相关的神经环路。

在神经环路示踪研究中，通常需要同时使用 2-3 种不同荧光蛋白；在不同的脑区分别注射带有不同颜色荧光蛋白的 PRV，经过一段时间后观察荧光蛋白的表达分布情况，被两种荧光同时标记到的神经元，说明同时与两个脑区有联系。例如，徐富强教授实验室曾向 C57/BL 小鼠两侧嗅球分别注射 PRV152(GFP) 和 PRV614 (RFP)，经过一段时间逆行，在嗅觉相关脑区观察到红色和绿色共同标记的神经元，说明这些神经元调控了双侧嗅球。

然而，目前已有的表达红色荧光蛋白的重组 PRV 病毒普遍存在荧光强度弱、成熟时间长、透射能力差等问题，不利于神经网络示踪研究。因此，有必要开发一种新的携带红色荧光蛋白的重组 PRV，使其表达的红色荧光蛋白亮度更强、成熟速度更快，更好地应用于神经环路示踪。

发明内容

针对现有技术的不足及实际需求，本发明提供了一种表达 E2-crimson 的重组伪狂犬病毒及其制备方法和应用，所述重组伪狂犬病毒中采用的红色荧光蛋白 E2-crimson 荧光强度高、成熟时间快、透射能力强，在神经环路示踪领域具有广泛的应用前景。

为达此目的，本发明采用以下技术方案：

第一方面，本发明提供了一种重组伪狂犬病毒载体，所述重组伪狂犬病毒载体包括 E2-crimson 基因；

所述 E2-crimson 基因的核酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列为：

atgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatccgatggtgagcaagggcg
aggagctgatcaaggagaacatgagaagcaagctgtacctggaaggcagcgtgaacggccaccagttcaagtgcacc
cacgaaggggagggcaagccctacgagggcacccagaccaacaggatcaaggtggtggagggaggccccctgccg
ttcgattcgacatcctggccaccatgtttatgtacgggagcaaggccttcacatcaagtacccaagggcctccccgattatt
taagcagtccttcctgagggcttcacatgggagagaacctggtgttcgaagacggggggcgtgctgaccgccaccag
gacaccagcctccaggacggcgagctcatctacaacgtgaagctgagaggggtgaacttcccagccaacggccccgt
gatgaagcagacaacactgggctgggagcccagcaccgagaccctgtaccccgtgacggcgccctggaaggcaga
tgcgacatggccctgaagctcgtgggcggggggccacctgcactgcaacttcaagaccacatacaaatccaagaaacc
gtcaagatgcccggcgctccactacgtggaccgcagactggaaagaatcaaggaggccgacaacgagacctacgtcga
gcagcacgaggtggctgtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaaacttaatggcatggacgagct
gtacaagtaa。

本发明中，E2-Crimson 是第一款采用标准远红光激光器有效激发的荧光蛋白，采用 E2-crimson 作为红色荧光蛋白，消光系数高达 $126000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，中等量子产率为 0.23，亮度强，荧光强度是 mRFP 的 2.3 倍，成熟时间比 mRFP 快三倍，缩短了实验时间，E2-crimson 在 611 nm 处具有最大吸收，646 nm 处具有最大发射，相对于 mRFP 发生了明显的红移，透射能力强，在神经环路示踪领域具有显著的应用潜力。

优选地，所述重组伪狂犬病毒载体采用 pBB5 载体作为空载体，向 pBB5

载体中连接入 E2-crimson 基因，得到重组伪狂犬病毒载体 pBB5-E2-crimson。

本发明中，由于采用 PRV152 基因组作为重组亲本，因此在构造重组载体时，选择含有 PRV152 基因组同源重组臂的 pBB5 载体连接 E2-crimson 基因。

第二方面，本发明提供了一种如第一方面所述的重组伪狂犬病毒载体的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：

采用限制性内切酶 NsiI-HF 处理 pCMVGF-E2-crimson 载体，同时采用限制性内切酶 pstI-HF 处理 pBB5 载体；

对两种酶切产物进行回收、连接，得到所述重组伪狂犬病毒载体 pBB5-E2-crimson。

本发明中，限制性内切酶 pstI-HF 与 NsiI-HF 互为同尾酶，即两种内酶切酶切后产生的粘性末端可以互补配对，采用 pstI-HF 与 NsiI-HF 处理后的载体可以在连接酶作用下连接起来，形成新的重组载体，E2-crimson 基因接到两个同源重组臂之间。

第三方面，本发明提供了一种重组伪狂犬病毒，所述重组伪狂犬病毒包括如第一方面所述的重组伪狂犬病毒载体。

第四方面，本发明提供了一种如第三方面所述的重组伪狂犬病毒的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：

(1) 采用限制性内切酶 SpeI 将重组伪狂犬病毒载体 pBB5-E2-crimson 进行线性化处理；

(2) 提取 PRV152 病毒基因组；

(3) 将线性化 pBB5-E2-crimson 与 PRV152 病毒基因组共转染宿主细胞，得到所述重组伪狂犬病毒。

根据本发明，步骤(1)采用限制性内切酶 *SpeI* 对重组载体 pBB5-E2-crimson 进行线性化处理，原因在于 *SpeI* 紧临 5'同源重组臂，采用 *SpeI* 酶切重组载体后，5'和 3'的同源重组臂以及中间的 E2-crimson 基因仍然连接在一起，没有被酶切分开，保证了下一步与 PRV152 基因组同源重组的顺利进行。

本发明中，采用 PRV152 病毒作为亲本，原因在于 PRV152 表达绿色荧光蛋白 EGFP，而 PRV-E2-crimson 带红色荧光，利用荧光颜色的不同，方便在荧光显微镜下区分亲本 PRV152 和重组 PRV-E2-crimson。

优选地，步骤(2)所述提取 PRV152 病毒基因组的方法包括：

采用 PRV152 病毒感染宿主细胞，使 PRV152 病毒在宿主细胞中扩增；收集宿主细胞，进行细胞裂解；DNA 提取得到所述 PRV152 病毒基因组。

优选地，步骤(3)所述宿主细胞包括 293 细胞、293T 细胞或 293F 细胞中的任意一种或至少两种的组合。

优选地，在步骤(3)之后还包括对重组伪狂犬病毒进行筛选和纯化的步骤。

本发明中，在绿色荧光 PRV152 病毒基础上，利用同源重组的方法，将 E2-crimson 基因连接在 PRV152 基因组上，构造出了能够稳定表达红色荧光蛋白 E2-crimson、能够自我复制、具有逆向示踪功能的 PRV-E2-crimson 病毒，主要步骤如下：

- (1) 构建含有 E2-crimson 基因以及同源重组臂的重组载体；
- (2) 采用限制性内切酶线性化同源重组载体；
- (3) 提取含有相同同源重组臂的 PRV152 基因组；
- (4) 将线性化的同源重组载体与 PRV152 基因组共转染宿主细胞，通过同源重组制备得到含 E2-crimson 的重组 PRV；

(5) 多轮筛选，获得重组成功的表达红色荧光蛋白的 PRV-E2-crimson；

(6) 纯化 PRV-E2-crimson 病毒，注射到小鼠的纹状体中，检测 PRV-E2-crimson 的感染表达效率。

第五方面，本发明提供了一种神经网络示踪剂，所述神经网络示踪剂包括如第一方面所述的重组伪狂犬病毒载体和/或如第三方面所述的重组伪狂犬病毒。

第六方面，本方面提供了一种试剂盒，所述试剂盒包括如第一方面所述的重组伪狂犬病毒载体、如第三方面所述的重组伪狂犬病毒或如第五方面所述的神经网络示踪剂。

第七方面，本发明提供了一种如第一方面所述的重组伪狂犬病毒载体、如第三方面所述的重组伪狂犬病毒、如第五方面所述的神经网络示踪剂或如第六方面所述的试剂盒在制备神经系统疾病检测试剂中的应用。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

(1) 本发明的重组 PRV-E2-crimson 采用 E2-crimson 作为红色荧光蛋白，荧光强度是 mRFP 的 2.3 倍，成熟时间比 mRFP 快三倍，缩短了实验时间，E2-crimson 在 611 nm 处具有最大吸收，646 nm 处具有最大发射，相对于 mRFP 发生了明显的红移，透射能力强；

(2) 本发明的重组 PRV-E2-crimson 在小鼠纹状体中可以高效地逆向标记神经环路，表达效率高，侵染能力强；

(3) 本发明的重组 PRV-E2-crimson 在神经环路示踪领域具有广泛的应用前景。

附图说明

图 1 为重组载体 pBB5-E2-crimson 的图谱和制备流程图；

图 2（A）为 PRV-E2-crimson 进行第一轮筛选结果图，图 2（B）为 PRV-E2-crimson 进行第二轮筛选结果图，图 2（C）为 PRV-E2-crimson 进行第三轮筛选结果图；

图 3 为 PRV-E2-crimson 在小鼠纹状体及其上游环路的表达情况。

具体实施方式

为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果，以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明，而非对本发明的限定。

实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

实施例 1 构建重组载体

本实施例由于采用 PRV152 基因组作为重组亲本，因此在构造重组载体时，采用含有 PRV152 基因组同源重组臂的 pBB5 载体连接 E2-crimson 基因，步骤如下：

如图 1 所示，采用限制性内切酶 *pst*I-HF（NEB）处理 pBB5 载体，同时采用限制性内切酶 *Nsi*I-HF（NEB）处理 pCMVGF-E2-crimson 载体，37℃ 下酶切 3 h，酶切体系如表 1-1 和表 1-2 所示，回收酶切产物后采用连接预混液（2×ligation premix，TAKARA）在 16℃ 下进行连接过夜，体系如表 1-3 所示，得到连接成功的 pBB5-E2-crimson 载体。

表 1-1 pBB5 载体酶切体系

试剂	用量
酶切缓冲液 10×CutSmart Buffer	3 μL
pstI-HF	1 μL
pBB5	1 μg
ddH ₂ O	补齐至 30 μL

表 1-2 pCMVGF-E2-crimson 载体酶切体系

试剂	用量
酶切缓冲液 10×CutSmart Buffer	3 μL
NsiI-HF	1 μL
pCMVGF-E2-crimson	1 μg
ddH ₂ O	补齐至 30 μL

表 1-3 连接体系

试剂	用量
连接预混液 2×ligation premix	5μL
pBB5 连接载体	0.5 μL
pCMVGF-E2-crimson 连接片段	4.5 μL

实施例 2 重组载体的线性化处理

重组载体与 PRV152 进行同源重组前，进行线性化处理，步骤如下：

采用限制性内切酶 SpeI 对 5 μg 重组载体 pBB5-E2-crimson 在 37℃ 下进行线性化处理 2 h，体系如表 2 所示，酶切后采用酚氯仿抽提纯化 DNA，得到线性化重组载体。

表 2 线性化酶切体系

试剂	用量
酶切缓冲液 10×CutSmart Buffer	5 μL
SpeI	2 μL
pBB5-E2-crimson	5 μg
ddH ₂ O	补齐至 50 μL

酚氯仿抽提纯化 DNA 的步骤如下：

向上述 50 μL 线性化酶切体系中加入 150 μL ddH₂O，随后加入 200 μL 酚氯仿抽提液，剧烈混匀；12000 rpm 4℃离心 10 min，取上清约 150 μL 置于新的 1.5 mL 离心管中，加入 20 μL 3 M 醋酸钠溶液，加入 500 μL 无水乙醇混匀，在 -20℃冰箱放置半小时；12000 rpm 4℃离心 10 min，弃上清，可以看到管底有白色沉淀，加入 500 μL 无水乙醇洗涤 DNA 沉淀两次，最后一次洗涤后将上清倒掉，室温放置保证乙醇挥发完全，加入 50 μL ddH₂O 溶解 DNA 沉淀，置于 -20℃备用。

实施例 3 PRV152 基因组提取

本实施例采用 PRV152 病毒作为亲本，原因在于 PRV152 表达绿色荧光蛋白 EGFP，而 PRV-E2-crimson 带红色荧光，利用荧光颜色的不同，方便在荧光显微镜下区分亲本 PRV152 和重组 PRV-E2-crimson，PRV152 基因组的提取步骤如下：

- （1）采用 PRV152 病毒感染宿主细胞猪肾细胞 PK15，使 PRV152 病毒在宿主细胞中扩增；
- （2）收集 PK15 细胞，加入细胞裂解液，37℃水浴过夜；
- （3）利用酚氯仿抽提法纯化 PRV152 基因组 DNA，具体为在裂解液中加入

入等体积的酚氯仿抽提液，上下剧烈摇晃混匀，4℃下 12000 rpm 离心 10 min；吸取上清至新的 EP 管中，加入等体积的酚氯仿抽提液，剧烈摇晃混匀，4℃下 12000 rpm 离心 10 min；重复上步一次；向上清中加入 2 倍体积的预冷的异丙醇，轻轻倒转混匀，4℃下 5000 rpm 离心 1 min；重复上步一次；弃上清，沉淀采用 800 μ L 75%乙醇洗涤，4℃下 12000 rpm 离心 5 min；重复上步一次；弃上清，12000 rpm 离心 5 min，用枪头吸取残余液体，打开管盖，室温放置 5 min，加入 50 μ L ddH₂O 溶解 DNA 沉淀，置于-20℃中备用。

实施例 4 重组 PRV 病毒的制备

本实施例利用钙转染的方法，将线性化 pBB5-E2-crimson 与 PRV152 基因组导入 293T 细胞中，两者在重组酶的作用下，借助同源重组臂，完成同源重组过程，得到重组 PRV-E2-crimson。

提前一天将 293T 细胞铺于六孔板的一个孔中，保证第二天密度达到 60%~70%；第二天，转染前 4 小时更换新鲜的完全培养基(含 10%FBS+1%P/S)，转染试剂包括 A (12.5 μ L 2M CaCl₂，1 μ g PRV152 基因组 DNA，1 μ g 线性化 pBB5-E2-crimson DNA，2 μ g 小牛胸腺 DNA，用 ddH₂O 补齐至 100 μ L) 和 B (100 μ L 2 $\times$ HBS)；

A 混合液配好后混合均匀，随后将 B 逐滴加入 A，并用手轻弹混匀（或用涡旋仪混匀）；室温放置 20 min 后，加入预先铺好的细胞中；

PRV152 基因组 DNA 与线性化 pBB5-E2-crimson 拥有长同源臂和短同源臂，293T 细胞中含有重组酶，两者在重组酶的作用下相互交换同源臂中的成分，完成同源重组。

实施例 5 重组 PRV 病毒的筛选

由于同源重组效率有限，形成的病毒产物中，既有重组成功的红色荧光 PRV-E2-crimson，也有绿色荧光亲本 PRV152，本实施例通过筛选得到重组成功的 PRV-E2-crimson，具体为：

将上清液进行不同浓度的稀释，加入到铺有密度为 90%左右的 PK15 细胞的 96 孔板中，培养 24 h 后在荧光显微镜下挑出只表达红色荧光不表达绿色荧光的孔，取上清继续重复上述筛选步骤，三轮后挑选出纯粹的红色荧光 PRV-E2-crimson，如图 2（A）、图 2（B）和图 2（C）所示，方框代表每一轮挑选出来的用作下一轮筛选的孔。

实施例 6 小鼠纹状体中 PRV-E2-crimson 的感染表达效率

选取三只 8 周 C57 小鼠，向小鼠纹状体各注射 2 μ L、滴度为 2×10^9 pfu/mL 的 PRV-E2-crimson，三天后小鼠出现明显的 PRV 感染迹象，行动迟缓、食欲不振、身体消瘦，将小鼠灌流取脑，利用免疫组化方法切片染色，观察脑片结果。

如图 3 所示，STR(striatum)为纹状体，是病毒的注射位点，Amy(amygdala)为杏仁核，STN(subthalamic nucleus)为丘脑底核，VTA(ventral tegmental area)为腹侧被盖区，可以看出，PRV-E2-crimson 在纹状体及其上游环路有很高的表达效率。

综上所述，本发明的重组 PRV-E2-crimson 采用 E2-crimson 作为红色荧光蛋白，荧光强度是 mRFP 的 2.3 倍，成熟时间比 mRFP 快三倍，缩短了实验时间，对细菌和哺乳动物细胞无细胞毒性，E2-crimson 在 611 nm 处具有最大吸收，646 nm 处具有最大发射，相对于 mRFP 发生了明显的红移，透射能力强；所述重组 PRV-E2-crimson 在小鼠纹状体中可以高效地逆向标记神经环路，表达效率高，侵染能力强，在神经环路示踪领域具有广泛的应用前景。

申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法，但本发明并不局限于上述详细方法，即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种重组伪狂犬病毒载体，其特征在于，所述重组伪狂犬病毒载体包括 E2-crimson 基因；

所述 E2-crimson 基因的核酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

2、根据权利要求 1 所述的重组伪狂犬病毒载体，其特征在于，所述重组伪狂犬病毒载体的空载体为 pBB5 载体。

3、一种如权利要求 1 或 2 所述的重组伪狂犬病毒载体的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

采用限制性内切酶 NsiI-HF 处理 pCMVGF-E2-crimson 载体，同时采用限制性内切酶 pstI-HF 处理 pBB5 载体；

对两种酶切产物进行回收、连接，得到所述重组伪狂犬病毒载体 pBB5-E2-crimson。

4、一种重组伪狂犬病毒，其特征在于，所述重组伪狂犬病毒包括如权利要求 1 或 2 所述的重组伪狂犬病毒载体。

5、一种如权利要求 4 所述的重组伪狂犬病毒的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

(1) 采用限制性内切酶 SpeI 将重组伪狂犬病毒载体 pBB5-E2-crimson 进行线性化处理；

(2) 提取 PRV152 病毒基因组；

(3) 将线性化 pBB5-E2-crimson 与 PRV152 病毒基因组共转染宿主细胞，得到所述重组伪狂犬病毒。

6、根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)所述提取 PRV152 病毒基因组的方法包括：

采用 PRV152 病毒感染宿主细胞，使 PRV152 病毒在宿主细胞中扩增；收集宿主细胞，进行细胞裂解；DNA 提取得到所述 PRV152 病毒基因组；

优选地，步骤（3）所述宿主细胞包括 293 细胞、293T 细胞或 293F 细胞中的任意一种或至少两种的组合。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的制备方法，其特征在于，在步骤（3）之后还包括对重组伪狂犬病毒进行筛选和纯化的步骤。

8、一种神经网络示踪剂，其特征在于，所述神经网络示踪剂包括如权利要求 1 或 2 所述的重组伪狂犬病毒载体和/或如权利要求 4 所述的重组伪狂犬病毒。

9、一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括如权利要求 1 或 2 所述的重组伪狂犬病毒载体、如权利要求 4 所述的重组伪狂犬病毒或如权利要求 8 所述的神经网络示踪剂。

10、一种如权利要求 1 或 2 所述的重组伪狂犬病毒载体、如权利要求 4 所述的重组伪狂犬病毒、如权利要求 8 所述的神经网络示踪剂或如权利要求 9 所述的试剂盒在制备神经系统疾病检测试剂中的应用。

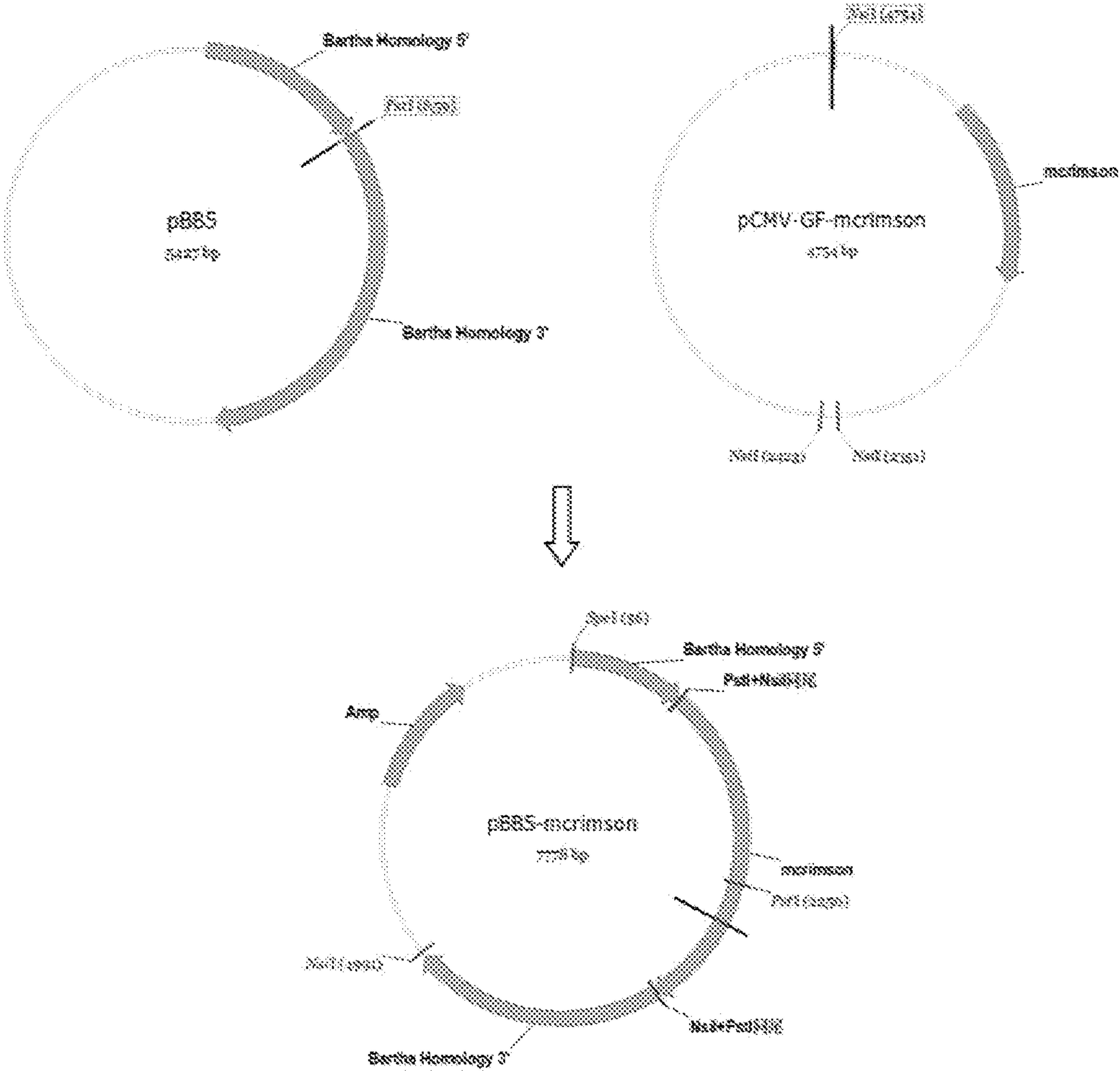


图 1

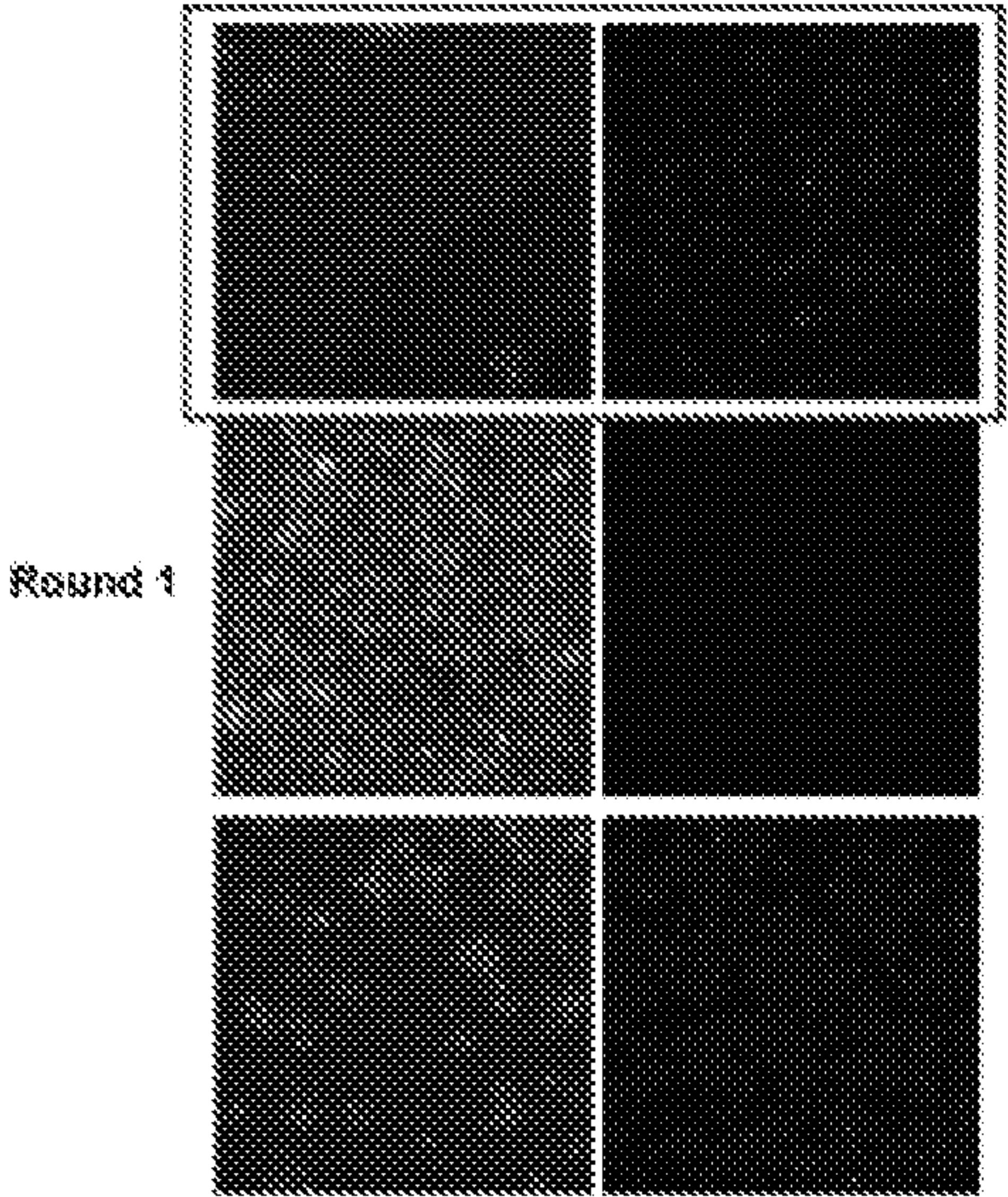


图 2 (A)

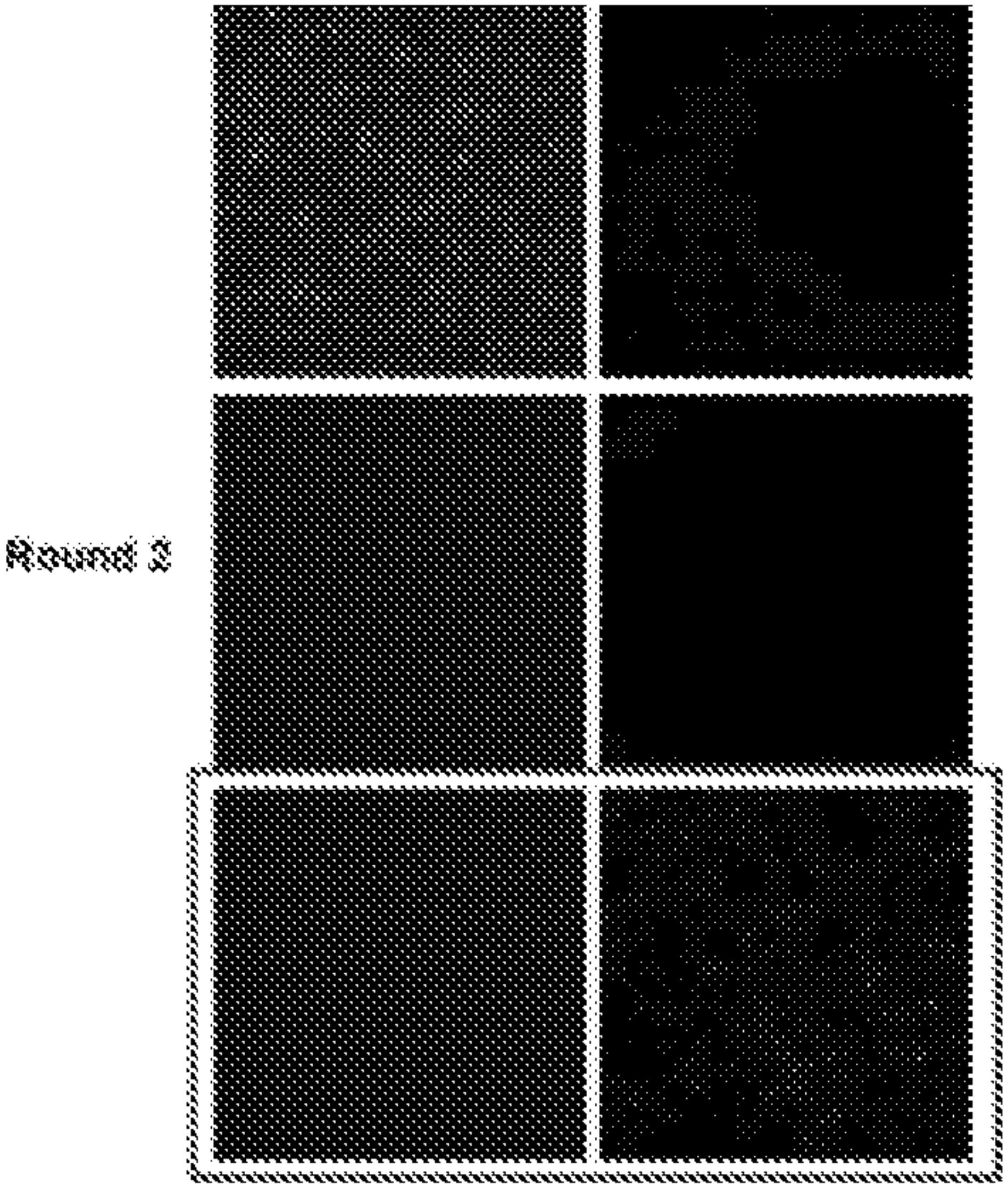


图 2 (B)

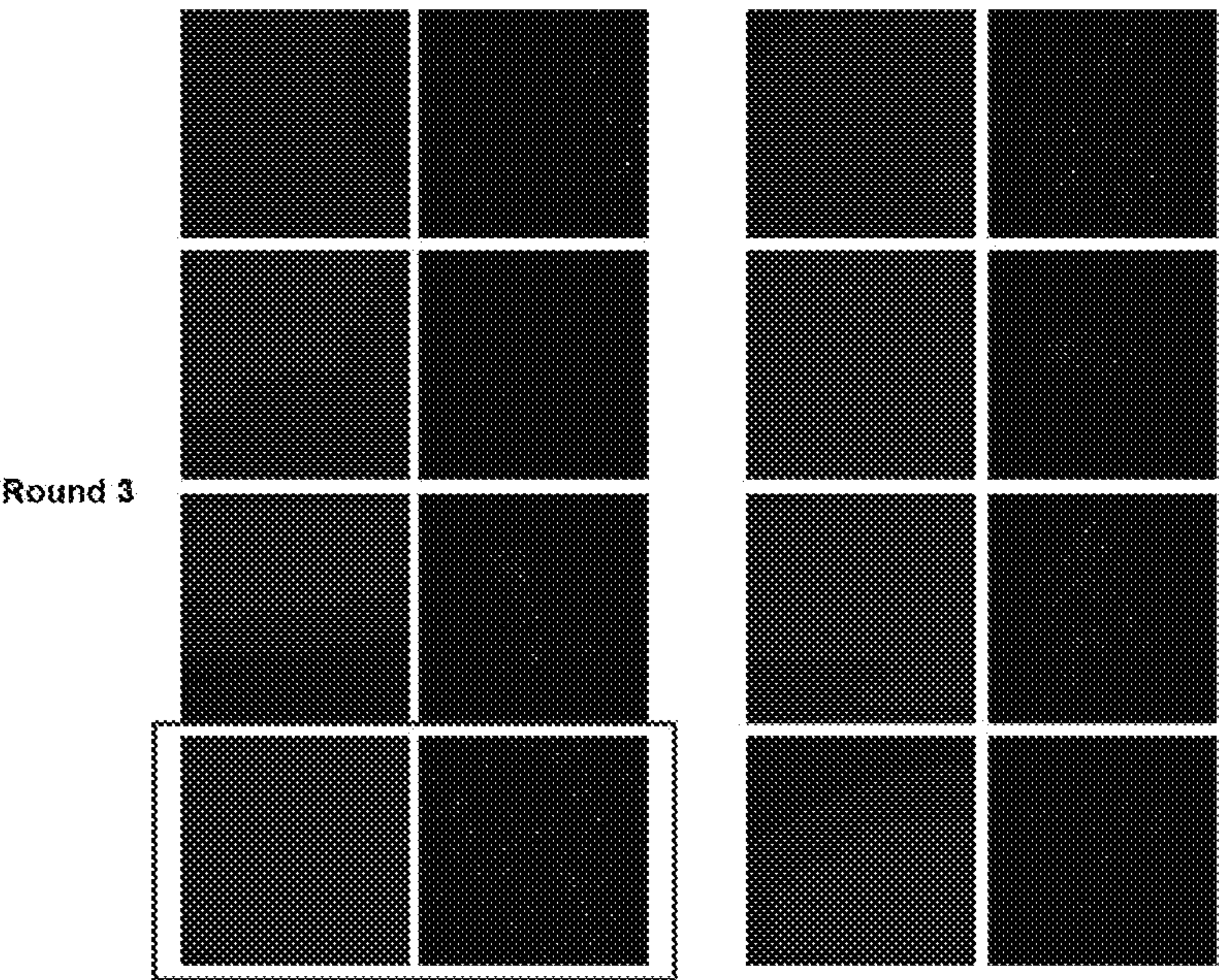


图 2 (C)

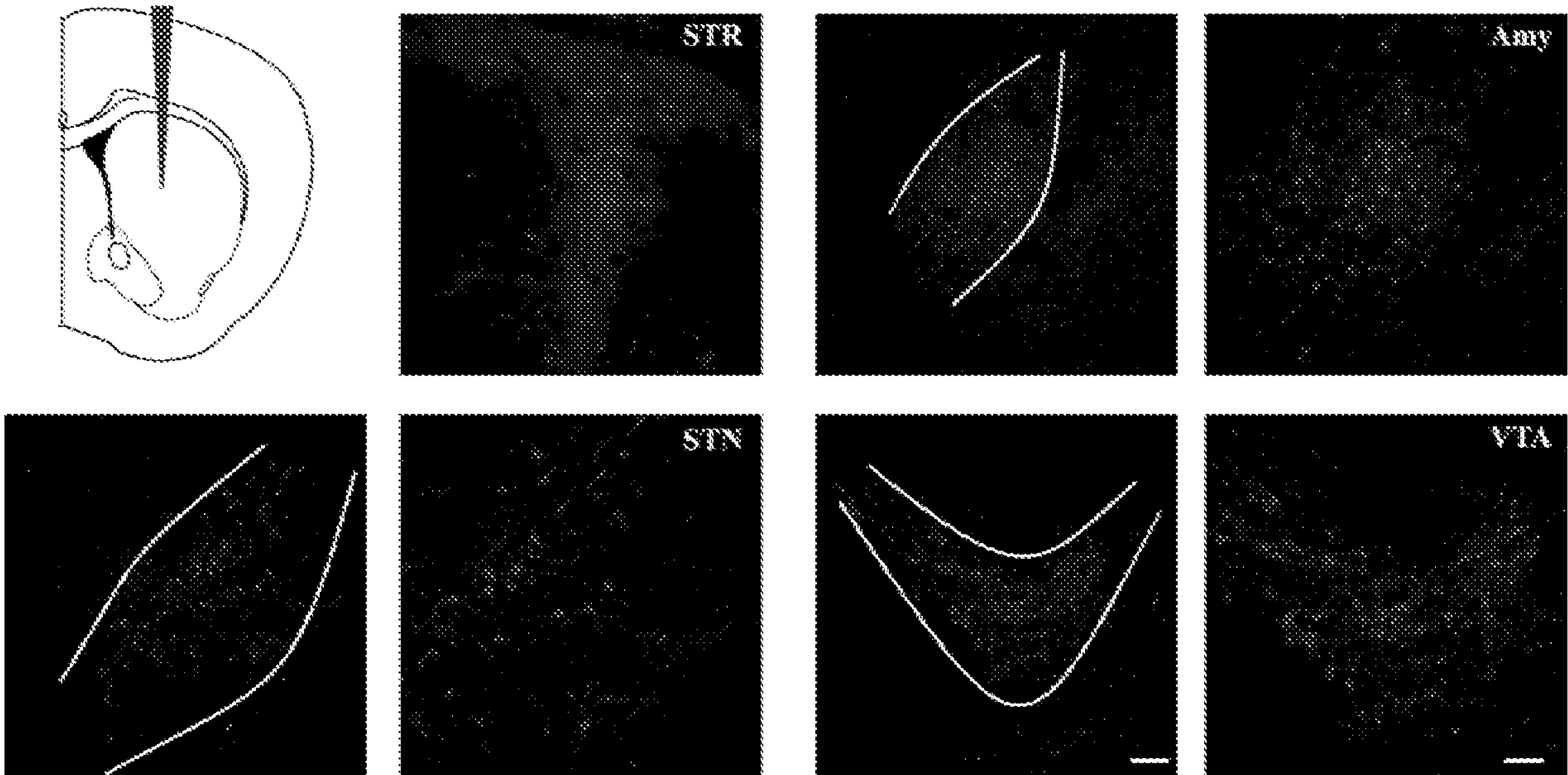


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/863(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)i; G01N 33/68(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)

C12N; G01N

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)

VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI: applicant/inventor: pbb5, PRV152, E2-crimson, pstI-HF, 伪狂犬病毒, 荧光蛋白, NsiI-HF, sequence 1, fluorescence, PRV, 示踪剂

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110804627 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 18 February 2020 (2020-02-18) claims 1-10	1-10
Y	CN 109943539 A (WUHAN INSTITUTE OF PHYSICS AND MATHEMATICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 June 2019 (2019-06-28) claim 1	1-10
Y	CN 107109400 A (NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN et al.) 29 August 2017 (2017-08-29) embodiment 1	1-10
Y	CN 106995824 A (WUHAN INSTITUTE OF PHYSICS AND MATHEMATICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 01 August 2017 (2017-08-01) claim 1	1-10
Y	CN 108503701 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 07 September 2018 (2018-09-07) abstract	1-10

☒ 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
- “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 February 2021

Date of mailing of the international search report

20 February 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129494

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105385666 A (CHINA INSTITUTE OF VETERINARY DRUGS CONTROL) 09 March 2016 (2016-03-09) entire document	1-10
A	CN 103981153 A (CHINA INSTITUTE OF VETERINARY DRUGS CONTROL) 13 August 2014 (2014-08-13) entire document	1-10
A	WO 2017074865 A1 (BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL, INC. et al.) 04 May 2017 (2017-05-04) entire document	1-10
A	WO 2016130568 A1 (PERKINS, EDWARD et al.) 18 August 2016 (2016-08-18) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129494

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/129494

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110804627	A	18 February 2020	None			
CN	109943539	A	28 June 2019	None			
CN	107109400	A	29 August 2017	US	2017369903	A1	28 December 2017
				CA	2973943	A1	21 July 2016
				JP	WO2016114405	A1	19 October 2017
				US	2020157571	A1	21 May 2020
				EP	3246406	A1	22 November 2017
				US	2020190537	A1	18 June 2020
				JP	6770224	B2	14 October 2020
				EP	3246406	A4	04 July 2018
				TW	201636426	A	16 October 2016
				SG	CN 11201705820	A	30 August 2017
					U		
				WO	2016114405	A1	21 July 2016
				TW	I696700	B	21 June 2020
				US	10544431	B2	28 January 2020
				KR	20170101926	A	06 September 2017
CN	106995824	A	01 August 2017	CN	106995824	B	24 December 2019
CN	108503701	A	07 September 2018	CN	108503701	B	24 July 2020
CN	105385666	A	09 March 2016	CN	105385666	B	25 January 2019
CN	103981153	A	13 August 2014	CN	103981153	B	07 July 2017
WO	2017074865	A1	04 May 2017	CA	3003006	A1	04 May 2017
				CN	108474789	A	31 August 2018
				US	2017115267	A1	27 April 2017
				BR	112018008356	A2	27 November 2018
				MX	2018005030	A	01 April 2019
				JP	2018537692	A	20 December 2018
				EP	3368898	A1	05 September 2018
				AU	2016347051	A1	24 May 2018
				US	10788477	B2	29 September 2020
WO	2016130568	A1	18 August 2016	CA	2975526	A1	18 August 2016
				JP	2018504937	A	22 February 2018
				EP	3256582	A4	20 June 2018
				AU	2016219470	A1	24 August 2017
				CN	107406843	A	28 November 2017
				EP	3256582	A1	20 December 2017
				US	2018010150	A1	11 January 2018

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/129494
A. 主题的分类 C12N 15/863(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)i; G01N 33/68(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) C12N; G01N 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)) VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI:申请人/发明人:pbb5, PRV152, E2-crimson, pstI-HF, 伪狂犬病毒, 荧光蛋白, NsiI-HF, 序列1, fluorescence, PRV, 示踪剂		
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
PX	CN 110804627 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2020年 2月 18日 (2020 - 02 - 18) 权利要求1-10	1-10
Y	CN 109943539 A (中国科学院武汉物理与数学研究所) 2019年 6月 28日 (2019 - 06 - 28) 权利要求1	1-10
Y	CN 107109400 A (国立研究开发法人产业技术综合研究所等) 2017年 8月 29日 (2017 - 08 - 29) 实施例1	1-10
Y	CN 106995824 A (中国科学院武汉物理与数学研究所) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 权利要求1	1-10
Y	CN 108503701 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2018年 9月 7日 (2018 - 09 - 07) 摘要	1-10
A	CN 105385666 A (中国兽医药品监察所) 2016年 3月 9日 (2016 - 03 - 09) 全文	1-10
A	CN 103981153 A (中国兽医药品监察所) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文	1-10
☒ 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 2021年 2月 2日		国际检索报告邮寄日期 2021年 2月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 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 奚静 电话号码 86-(10)-53961974

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/129494

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	WO 2017074865 A1 (BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL, INC. 等) 2017年 5月 4日 (2017 - 05 - 04) 全文	1-10
A	WO 2016130568 A1 (PERKINS, EDWARD等) 2016年 8月 18日 (2016 - 08 - 18) 全文	1-10

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
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/CN2020/129494			
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	110804627	A	2020年 2月 18日	无			
CN	109943539	A	2019年 6月 28日	无			
CN	107109400	A	2017年 8月 29日	US	2017369903	A1	2017年 12月 28日
				CA	2973943	A1	2016年 7月 21日
				JP	W02016114405	A1	2017年 10月 19日
				US	2020157571	A1	2020年 5月 21日
				EP	3246406	A1	2017年 11月 22日
				US	2020190537	A1	2020年 6月 18日
				JP	6770224	B2	2020年 10月 14日
				EP	3246406	A4	2018年 7月 4日
				TW	201636426	A	2016年 10月 16日
				SG	11201705820U	A	2017年 8月 30日
				WO	2016114405	A1	2016年 7月 21日
				TW	I696700	B	2020年 6月 21日
				US	10544431	B2	2020年 1月 28日
				KR	20170101926	A	2017年 9月 6日
CN	106995824	A	2017年 8月 1日	CN	106995824	B	2019年 12月 24日
CN	108503701	A	2018年 9月 7日	CN	108503701	B	2020年 7月 24日
CN	105385666	A	2016年 3月 9日	CN	105385666	B	2019年 1月 25日
CN	103981153	A	2014年 8月 13日	CN	103981153	B	2017年 7月 7日
WO	2017074865	A1	2017年 5月 4日	CA	3003006	A1	2017年 5月 4日
				CN	108474789	A	2018年 8月 31日
				US	2017115267	A1	2017年 4月 27日
				BR	112018008356	A2	2018年 11月 27日
				MX	2018005030	A	2019年 4月 1日
				JP	2018537692	A	2018年 12月 20日
				EP	3368898	A1	2018年 9月 5日
				AU	2016347051	A1	2018年 5月 24日
				US	10788477	B2	2020年 9月 29日
WO	2016130568	A1	2016年 8月 18日	CA	2975526	A1	2016年 8月 18日
				JP	2018504937	A	2018年 2月 22日
				EP	3256582	A4	2018年 6月 20日
				AU	2016219470	A1	2017年 8月 24日
				CN	107406843	A	2017年 11月 28日
				EP	3256582	A1	2017年 12月 20日
				US	2018010150	A1	2018年 1月 11日