

(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 2023/213010 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/866 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/105424
- (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:
202210482505.0 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济
学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。朱敏 (ZHU, Min);
中国江苏省苏州市相城区济学路8号, Jiangsu
215137 (CN)。郭仕程 (GUO, Shicheng); 中国江
苏省苏州市相城区济学路8号, Jiangsu 215137
(CN)。邱群娟 (QIU, Qunnan); 中国江苏省苏州

市相城区济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。童
新宇 (TONG, Xinyu); 中国江苏省苏州市相城区
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,
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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CHIMERIC SILK USING BOMBYX MORI BY MEANS OF AUTOGRAPHAL CALIFORNICA NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

(54) 发明名称: 一种通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法

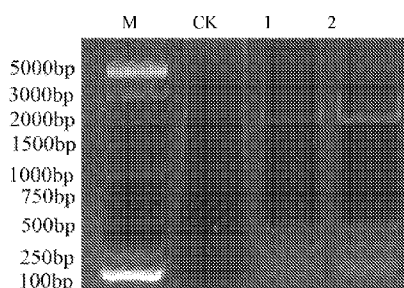


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing chimeric silk using bombyx mori by means of autographa californica nuclear polyhedrosis virus, comprising: constructing a plasmid pFAST-FibL-MaSp-c containing an FibL-MaSp-c-poly A FibL fragment, transforming into Escherichia coli containing AcBacmid DH10Ac, and screening to obtain recombinant AcBacmid-FibL-MaSp-c; transfecting an Sf-9 cell to obtain a recombinant virus AcNPV-FibL-MaSp-c, inoculating 5-instar bombyx mori larvae, feeding the 5-instar bombyx mori larvae for 1 day with fresh mulberry leaves which are dried after being soaked or sprayed with an antibiotic liquid medicine, and then feeding the 5-instar bombyx mori larvae with fresh mulberry leaves until mature bombyx mori is seen, namely, feeding the 5-instar bombyx mori larvae with fresh mulberry leaves which are soaked or sprayed with an ecdysone liquid medicine until mature bombyx mori is seen, or directly spraying the 5-instar bombyx mori larvae with the ecdysone liquid medicine until mature bombyx mori is seen; transferring the mature bombyx mori to a cocooning tool, cocooning, then harvesting cocoons, drying the cocoons, and reeling silk to obtain the chimeric silk, thereby meeting the need for the diversity of silk proteins in the preparation of various biological materials.

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明公开了通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法, 构建含FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段的质粒pFAST-FibL-MaSp-c, 转化含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌筛选获得重组AcBacmid-FibL-MaSp-c, 转染Sf-9细胞获得重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-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饲养1天, 后用新鲜桑叶饲养至见熟蚕, 用浸渍或喷洒过蜕皮激素药液的新鲜桑叶饲喂见熟蚕; 或直接用蜕皮激素药液体喷见熟蚕, 将熟蚕移至簇具, 营茧后采茧, 蚕茧烘干后, 经过缫丝获嵌合蚕丝, 满足制备各种生物材料对丝蛋白的多样性的需求。

发明名称：一种通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域，具体涉及一种通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝的嵌合蚕丝的方法。

背景技术

[0002] 蜘蛛丝机械性能优异、免疫原性小，在纺织、生物医用材料和国防工业领域具有广阔的应用前景。与一般的吐丝昆虫不同，蜘蛛有多个产丝腺体，能分别产生主壶腹腺丝、次壶腹腺丝、鞭毛状丝、胶性腺丝、葡萄状腺丝、管状腺丝和聚合状腺黏液蛋白。不同的蛛丝或蛛丝蛋白具有不同的生物学功能，其性能也有明显的差异。蛛丝蛋白具有3个功能区域，氨基酸序列的两端分别形成N端结构域和C端结构域，由不重复的氨基酸序列构成；蛛丝蛋白氨基酸序列的中间区域为简单氨基酸高度重复。蛛丝蛋白特性以及蛛丝的纤维性能主要取决于重复序列的结构特性。主壶腹腺丝（MaSp）又称索引丝或拖牵丝，是蛛丝中机械强度最好的丝。主壶腹腺丝主要有MaSp-1和-2种。MaSp-1的重复区域的主要特征基序为（GA）_n（n:6-14）或（A）_n（n:6-14）和GGX，可分别形成 β 折叠晶体结构和 3_{10} 螺旋结构，前者与丝的抗张强度有关，后者与延展性有关。MaSp-2的特征基序为GPX、QQ、GSG，可形成 β -turn螺旋结构，与丝的弹性有关。

[0003] 在野生状态下，蜘蛛每天产丝量不足1mg，产丝量非常少，难以满足人们对蜘蛛丝的需求。另外，蜘蛛为非群居性动物，且有相互残杀的生活习性，至今为止人们还没有能通过大规模群体饲养获取蜘蛛丝。近年来，随着生物技术的进步，人们已尝试利用基因工程技术在细菌、酵母、哺乳类动物培养细胞、昆虫细胞甚至通过转基因动物和植物表达蛛丝蛋白，并用纯化的重组蛋白制造人工仿蜘蛛丝或其他生物材料，相关研究已取得了很大进展。现有技术公开了一种提高力学机械性能的单多聚蛋白分子及其应用方法，采用蜘蛛大壶状腺丝蛋白I分子4个串联蛋白序列type1~type4中的一种序列作为单一的多聚蛋白分子

，构建这种单一多聚蛋白序列对应的外源基因载体，利用分子生物学技术将单一多聚蛋白序列整合到家蚕基因组内，最终获得能够稳定遗传的复合丝性能优异的新型家蚕品种，利用新型家蚕品种生产复合丝。现有技术通过家蚕天然的纺丝能力获得含有蜘蛛丝蛋白成份的嵌合蚕丝，在一定程度上改善了丝纤维的机械性能，由于受到将外源基因导入蚕卵和蚕卵人工孵化技术的限制，通过显微注射将基因导入蚕卵进行家蚕遗传修饰基本上局限在无实用生产价值的多化性家蚕品种。作为常识，生产上的实用品种均为二化性，所产卵为越年卵，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，因此现有技术多选择不需要浸酸处理多化性品种，因此人们仍希望通过一些新的策略和技术利用常规品种家蚕生产含有蛛丝蛋白的嵌合蚕丝。

发明概述

技术问题

[0004] 本发明目的是提供一种通过家蚕生产含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝的嵌合蚕丝的方法，不仅获得机械性能提高的蚕丝，尤其是避免丝长的过多下降，并且本发明适用所有家蚕品种。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表达金丝织网蜘蛛腺丝，获取含有蛛丝蛋白的嵌合蚕丝，相关技术方案没有见报道。

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：一种通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，包括下列步骤：（1）将FibL-MaSp-c-poly A_{FibL}片段克隆进pFAST-Bac-Dual的多克隆位点构建质粒pFAST-FibL-MaSp-c；所述FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段的序列为SEQ ID NO：1；

[0006] （2）将质粒pFAST-FibL-MaSp-c转化含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌，后涂布于LB琼脂培养基平板上培养，再挑取白色菌落，提取重组AcBacmid-FibL-MaSp-

c DNA, 优选的, LB琼脂培养基含有四环素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG和X-gal; 培养的温度为37℃; (3) 将重组AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA转染草地夜蛾培养细胞, 然后培养至细胞发病, 然后取细胞培养上清再次接种培养细胞, 然后培养至细胞发病, 再收集细胞培养上清, 离心纯化得到重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒粒子AcNPV-FibL-MaSp-c, 优选的, 培养细胞为Sf9培养细胞, 培养的温度为26~27℃; (4) 将步骤(3)收集的细胞培养上清或者重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒粒子AcNPV-FibL-MaSp-c接种家蚕幼虫, 然后饲养至上蔭; 然后营茧、采茧、缂丝, 得到嵌合蚕丝, 25℃环境下营茧, 7天后采茧, 优选的, 家蚕幼虫为5龄家蚕幼虫, 饲养至见熟蚕, 然后用蜕皮激素处理, 再上蔭; 进一步优选的, 家蚕幼虫饲养至见熟蚕过程中, 采用抗生素处理一次。

[0007] 本发明通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法进一步描述如下: (1) 合成家蚕丝素蛋白轻链基因启动子控制的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腺丝蛋白表达盒FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}, 其序列如SEQ ID NO: 1; (2) 将FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段克隆进pFAST-BacTm-Dual的多克隆位点构建质粒pFAST-FibL-MaSp-c; (3) pFAST-FibL-MaSp-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-FibL-MaSp-c DNA; (4) 将重组AcBacmid-FibL-MaSp-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-FibL-MaSp-c; (5) 重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c接种5龄家蚕幼虫, 用浸渍或喷洒过抗生素药液(500mg/L)的凉干后的新鲜桑叶于24℃~25℃饲养1天, 后用新鲜桑叶饲养至见熟蚕; 优选的, 抗生素药液、桑叶的用量比例为5~7L:100Kg; (6) 用浸渍或喷洒过蜕皮激素药液的新鲜桑叶饲喂见熟蚕1次; 或直接用蜕皮激素药液体喷见熟蚕1次; (7) 将熟蚕移至簇具, 在25℃环境下营茧, 7天后采茧; (8) 蚕茧烘干后, 经过缂丝获含金丝织网蜘蛛腺丝的嵌合蚕丝。

- [0008] 上述技术方案中，步骤(5)中，5龄家蚕幼虫接种重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c的量为 $10^4 \sim 10^7$ 拷贝/蚕；抗生素药液为环丙沙星或氟哌酸或氟苯尼考药液；蜕皮激素药液的浓度为22.5mg/L，抗生素药液、桑叶的用量比例为5~7L：100Kg；如选择喷见熟蚕的方法，蜕皮激素药液用量以润湿家蚕体表为度。
- [0009] 本发明方法中，构建FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}表达盒的优选方案是根据SEQ ID NO: 1序列采用全化学合成的方法。FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}表达盒也可以通过PCR克隆的策略制备。将FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段克隆进pFAST-Bac[™]-Dual的多克隆位点构建质粒pFAST-FibL-MaSp-c中，FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段克隆进pFAST-Bac[™]-Dual（Invitrogen公司产品）的多克隆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；挑取白色菌落，提取重组AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA中，可以用lightF（SEQ ID NO:2）和LighR：（SEQ ID NO:3）引物对AcBacmid-FibL-MaSp-c进行PCR鉴定；制备重组病毒时，对纯化的AcNPV-FibL-MaSp-c DNA，通过PCR扩增并结合PCR产物的序列测定进行确认，通过TCID₅₀或定量PCR对上清中的病毒滴度进行检测，如获得的培养细胞上清中的病毒滴度较低，可以进一步接种培养细胞，以便获得高病毒滴度的细胞培养上清，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，以进一步提高病毒的滴度。
- [0010] 本发明中，家蚕品种优选丝茧育实用家蚕品种，例“菁松×皓月”，也可以选用家蚕原种，如“75新”。现有蚕卵注射的方法无法适用比如丝茧育实用家蚕品种等好的品种，会导致浸酸死亡，本发明采用新的方法，成功解决了此问题，适用所有家蚕品种，尤其是丝茧育实用家蚕品种。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-FibL-MaSp-c。
- [0011] 本发明中，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，选用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优选为，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。

发明的有益效果

有益效果

- [0012] 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. 通过直接饲养蜘蛛难以大量获得蜘蛛丝，本发明技术可以利用家蚕丝腺高水平合成蛋白的能力和家蚕的吐丝纺茧的生物学习性大量获得含有金丝织网蜘蛛大壶状腺丝的嵌合蚕丝。
- [0013] 2. 现有技术通过大肠杆菌、酵母、动物细胞或转基因动植物能够表达出蜘蛛丝蛋白，要进一步获得蜘蛛丝纤维，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能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的嵌合蚕丝，且所获得的嵌合丝可聚集蚕丝和蜘蛛索引丝的优势。
- [0014] 3. 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核型多角体病毒介导在家蚕后部丝腺表达金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白，并使重组大壶状腺丝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。

对附图的简要说明

附图说明

- [0015] 图1为实施例一中重组AcBacmid-FibH-MaSp-c的鉴定。提取重组AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA，用引物lightF（SEQ ID NO:2）和LighR：（SEQ ID NO:3）进行PCR鉴定。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳分离。M，DNA标准分子量；泳道CK，野性Bacmid；泳道1和泳道2，重组AcBacmid-FibL-MaSp-c。
- [0016] 图2 为实施例一中RT-qPCR检测 AcNPV-FibL-MaSp-c感染家蚕丝腺中MaSp-c的

相对表达水平。以 10^6 拷贝重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c接种“菁松×皓月”5龄起蚕，取接种后第3、4、5天的后部丝腺，提取总RNA，反转录成cDNA后，用引物qc-F (SEQ ID NO:4) 和qc-R (SEQ ID NO:5) 通过定量PCR检测MaSp-c相对表达水平。并同时用引物eIF4-1 (SEQ ID NO: 6) 和引物 eIF4-2 (SEQ ID NO: 7) 检测内参基因真核细胞起始因子4A的表达。

- [0017] 图3为实施例一中Western blot检测家蚕（菁松×皓月）感染 AcNPV-FibL-MaSp-c重组病毒3天后的后部丝腺中表达的MaSp-c。CK，对照家蚕丝腺（未感染）；泳道1，5龄第3天注射 10^4 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道2，5龄第4天注射 10^4 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道3，5龄第2天注射 10^6 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道4，5龄第3天注射 10^6 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道5，5龄第4天注射 10^6 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道6，5龄第2天注射 10^5 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道7，5龄第3天注射 10^5 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒；泳道8，5龄第4天注射 10^6 拷贝的 AcNPV-FibL-MaSp-c病毒。一抗为抗MaSp-c抗体，二抗为HRP标记的羊抗兔IgG。
- [0018] 图4 为实施例一中的Western blot杂交检测茧丝中的MaSp-c。泳道M，标准分子量DNA；泳道Ck，未感染病毒AcNPV-FibL-MaSp-c蚕的丝；泳道1，感染AcNPV-FibL-MaSp-c蚕的丝。一抗为抗MaSp-c，二抗为HRP标记的羊抗兔IgG。
- [0019] 图5为实施例二中免疫组化检测AcNPV-FibL-MaSp-c感染丝腺中MaSp-c的分泌表达。A，未感染AcNPV-FibL-MaSp-c病毒对照蚕的丝腺；B和C，5龄蚕感染病毒AcNPV-FibL-MaSp-c 48、72小时的丝腺。一抗为抗MaSp-c抗体，二抗为HRP标记的羊抗兔IgG。
- [0020] 图6为实施例二中Western blot检测家蚕（75新）感染AcNPV-FibL-MaSp-c重组病毒3天后的后部丝腺中表达的MaSp-c。
- [0021] 图7为实施例二中SDS-PAGE检测蚕丝蛋白。泳道M，标准分子量DNA；泳道1-4，5龄感染AcNPV-FibL-MaSp-c病毒的蚕的丝素；CK，对照蚕丝素。
- [0022] 图 8为实施例二中 Western

blot检测蚕丝中的MaSp-c。泳道M，标准分子量DNA；

泳道1-4，5龄感染AcNPV-FibL-MaSp-c病毒的蚕的丝素；CK，对照蚕丝素。

发明实施例

本发明的实施方式

[0023] 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcNPV）为杆状病毒的模式种，杆状病毒的主要宿主为昆虫，杆状病毒在控制昆虫种群数量方面发挥重要作用。随着研究的深入，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的研究。杆状病毒种类繁多，不同的杆状病毒的宿主域、感染性、致病性各不相同。本发明具体制备操作为本领域常规方法，也可根据商品说明书操作，比如合成序列、克隆、转化、转染、感染、养蚕、上簇、营茧、采茧、缂丝等。

[0024] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述：实施例一：通过“菁松×皓月”品种家蚕生产含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白的嵌合蚕丝的方法：1、化学合成表达盒FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}序列，在序列的二侧分别添加 XhoI和 SphI位点，尔后委托商业公司进行化学合成，合成的序列见SEQ ID NO：1。

[0025] 2、质粒pFAST-FibL-MaSp-c构建：将FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段克隆进pFAST-BacTM-Dual（Invitrogen公司产品）的 XhoI和 SphI位点构建质粒pFAST-FibL-MaSp-c。

[0026] 3、重组Bacmid AcBacmid-FibL-MaSp-c的筛选：将pFAST-FibL-MaSp-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-FibL-MaSp-c DNA，用引物lightF（SEQ ID NO:/2）和LighR（SEQ ID NO:3）进行PCR鉴定，扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示，从AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA中可扩增出与理论分子量相符的约2kb的特异性条带，而从野生性AcBacmid DNA中扩增不出，表明重组Bacmid构建成功。

- [0027] 4、重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c构建：将重组AcBacmid-FibL-MaSp-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。
- [0028] 5、AcNPV-FibL-MaSp-c病毒粒子的纯化与病毒拷贝数的测定：步骤4中的细胞培养上清，在4℃条件下，8000转/分钟离心10分钟，反复2次；取上清，以30000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，测定其TCID₅₀，计算贮备液中病毒的拷贝数。
- [0029] 6、RT-qPCR检测 AcNPV-FibL-MaSp-c感染家蚕丝腺中MaSp-c的相对表达水平：以10⁶拷贝重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c接种“菁松×皓月”5龄起蚕，取接种后第3、4、5天的后部丝腺，提取总RNA，反转录成cDNA后，用引物qc-F（SEQ ID NO:4）和qc-R（SEQ ID NO: 5）通过定量PCR检测MaSp-c相对表达水平。并同时用引物eIF4-1（SEQ ID NO: 6）和引物 eIF4-2（SEQ ID NO: 7）检测内参基因真核细胞起始因子4A的表达。结果如图2所示，AcNPV-FibL-MaSp-c进入丝腺后部组织，并转录MaSp-c，其转录水平随着病毒的感染而明显提高。
- [0030] 7、Western blot检测家蚕（菁松×皓月）感染重组病毒 AcNPV-FibL-MaSp-c 3天后的后部丝腺中表达的MaSp-c：5龄第3、4天分别注射10⁴拷贝，5龄第2、3、4天分别注射10⁶拷贝，5龄第2、3天分别注射10⁵拷贝以及5龄第4天注射10⁶拷贝的病毒，3天后取后部丝腺组织进行Western blot 检测，一抗用抗MaSp-c抗体，二抗用HRP标记的羊抗兔IgG。结果如图3所示，接种重组病毒组均可检测到代表MaSp-c表达的特异性条带。
- [0031] 8、重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c（贮备液）接种家蚕：“菁松×皓月”品种家蚕常规饲育至5龄起蚕（秋蚕），按每条蚕接种10⁶拷贝的病毒。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/100Kg均匀喷洒于桑叶叶面，桑叶正反面湿润。喷洒环丙沙星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。
- [0032] 9、家蚕添食蜕皮激素：配制22.5mg/L的蜕皮激素药液，按6L/100Kg均匀喷洒

于桑叶叶面，桑叶正反面湿润，凉干后，饲喂上述见熟蚕1次；然后移至簇具，在25℃环境下营茧，7天后采茧。

[0033] 10、鲜茧烘干后贮藏，缂丝前，贮藏干茧常规脱胶后，经过缂丝获得嵌合蚕丝；取嵌合蚕丝用溴化锂溶液溶解后的蛋白溶液加入到透析膜中，透析72小时后进行Western blot检测，结果如图4所示，可观察到MaSp-c信号，说明茧丝中含有MaSp-c。

[0034] 常规测试上述嵌合蚕丝的强力伸长率曲线，评估其机械性能，以没有感染病毒AcNPV-FibL-MaSp-c蚕的丝为对照。结果如表1所示，本发明嵌合蚕丝的强力、伸长率均有提高，但单粒茧丝长下降，不过与现有方法相比，本发明单粒茧丝长保持未感染家蚕丝长的60%以上属于显著的进步。

[0035] 表 1 嵌合蚕丝与正常蚕的丝的性能比较

测试 样本	强力 (MPa)		伸长率%		丝长 m		直径 μm	
	对照	嵌合蚕 丝	对照	嵌合 蚕丝	对照	嵌合蚕 丝	对照	嵌合 蚕丝
1	209.99	244.93	10.36	14.34	997.00	662	24	25.2
2	212.69	245.37	12.12	15.76	991.25	660.3	21.5	24.8
3	217.15	251.37	11.56	13.70	1012.50	655.75	21	24.2
4	207.68	250.11	12.28	14.15	1002.50	677.50	23.3	26.0
5	203.99	252.285	11.44	14.88	1014.38	688.75	22.1	26.1

。

[0036] 实施例二：通过“75新”品种家蚕生产含金丝织网蜘蛛大壶状腺丝蛋白的嵌合蚕丝的方法

[0037] 1. 重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c的制备：同实施实例一的步骤1-5；

[0038] 2. 重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c感染的“75新”品种家蚕后部丝腺中MaSp-c的分泌表达检测：5龄起蚕接种 10^6 拷贝的病毒，48、72小时后，取后丝腺制作切片，通过免疫组化检测AcNPV-FibL-MaSp-c感染丝腺中MaSp-c的分泌表达，检测时一抗用抗MaSp-c抗体，二抗用HRP标记的羊抗兔IgG。结果如图6所示，感染丝腺内腔中可观察到代表MaSp-c的棕色信号，说明MaSp-c表达并分泌至腺腔

- 。
- [0039] 3. Western blot检测重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c感染75新家蚕3天后在后部丝腺中表达的MaSp-c: 5龄起蚕接种 10^6 拷贝的病毒, 48、72小时后, 取后丝腺通过Western blot检测MaSp-c的表达, 结果如图7所示, 在病毒感染的丝腺样本中可观察到代表MaSp-c的特异性信号条带, 说明MaSp-c已成功表达。
- [0040] 4. 重组病毒AcNPV-FibL-MaSp-c接种家蚕: “75新”品种家蚕饲育至5龄起蚕, 按每条蚕接种 10^6 拷贝的病毒。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/100Kg均匀喷洒于桑叶叶面, 桑叶正反面湿润。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。
- [0041] 5. 家蚕体喷蜕皮激素: 配制22.5mg/L的蜕皮激素药液, 体喷于步骤5的蚕的体表, 以湿润为度。上簇、营茧、采茧同实施例一中的步骤9。
- [0042] 6. 鲜茧烘干后贮藏。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的嵌合蚕丝。SDS-PAGE、Western blot常规检测嵌合蚕丝蛋白, 结果如图8所示, 在病毒感染的蚕的茧丝样本中可观察到代表MaSp-c条带; Western blot检测结果如图9所示, 病毒感染的蚕的茧丝样本中可观察到代表MaSp-c信号条带, 说明蚕茧丝中含有MaSp-c。感染家蚕的单粒茧丝长最少为未感染家蚕单粒茧丝长的58%。
- [0043] 现有技术通过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。关键的, 现有用蚕生产蜘蛛丝嵌合蚕丝的方法, 极大降低

了丝长，实验研究发现，重组得到的丝长最高为原蚕丝长的41%。现有技术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；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蜘蛛丝蛋白的嵌合蚕丝，取得显著的技术进步。

序列表自由内容

[0044] SEQ ID NO: 1:

[0045] CTCGAGGTACGGTTCGTAAAGTTCACCTGCGGCTATATTCCGACTCGCCAAGTTACGTCAGTCGTATT
GTAATGAGCGATTTAGTGGGCAACTTCATTCTGTTAATTTTGTGTCACGGTGC GCGCGCATCGTAAAAC
TTCACCTCTCATAGATTTTTTCATAACGCGCCTAAAGAAGTATAACTTCAATAATTTAAATTTAAAAAAA
ACATGCATAGAATAATTATATGAATTATTTAAAAATGTCATTTACCGACATTGACATAACAGACGACGTT
AACACTACAAAACATTTTAATTCCACATTGTTACATATTCAACAGTTAAATTTGCGTTAATTCTCGATG
CGAACAAATATAAGAACAATCGGATCAATTAGATCGCTTTGTTTCGAACAACACTTAGTTTAACTAGAG
GCGTACACCTCAAGAAATCATCTTCATTAGAAACTAAACCTTAAAAATCGCAATAATAAAGCATAGTCAA
TTTTAACTGAAATGCAAAGTCTTTTGAACGTTAGATGCTGTCAGCGTTCGTTGGTACAGTTGTTTGATA
TTTATTTTAATTGTCTTTTTATATATAAATAGTGGAACATTAATCACGGAATCCTGTATAGTATATACC
GATTGGTCACATAACAGACCACTAAAATGAAACCTATCTTCCTCGTTCTGCTGGTGGCTACATCTGCCT
ATGCCGCCCATGGTCTTCGACGGAGTTGGCCGACGCTTTTATCAACGCTTTCCTCAATGAAGCCGGAA
GAACTGGCGCTTTCACCGCCGACCAACTCGACGATATGTCTACCATTGGTGACACCCTGAAAACAGCTA
TGGATAAGATGGCCAGATCCAACAAATCATCTCAATCGAAGCTCCAGGCTCTGAATATGGCTTTCGCTT
CATCAATGGCTGAAATCGCTGCCGTGGAACAAGGTGGATTGAGCGTTGCTGAAAAACAAACGCTATTG
CCGATTCCCTCAATTCGGCTTTCTACCAAAACAACTGGAGCCGTTAACGTCCAGTTCGTCAATGAAATAA
GAAGTCTCATCTCAATGTTGCTCAGGCCAGCGCTAACGAAGCTAGCTACGGCGGTGGATACGGCGGTG
GACAAGGCGGTCAATCTGCTGGTGCTGCCGCTGCCGCTGGTGCTGGACAAGGTGGTTACGGTGGACTGG
GCGGTCAAGGTGCTGGTAGTGCCGCTGCCGCTGCCGCTTCAGGAGCAGGTCAAGGTGGTTATGGTGGAG
TGGGAAACCAGGGTGCTGGAAGAGGCGCCGAGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGCGGTGCTGGTCAAGGTG
GTTACAATGGTGGACAAGGACCTTCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCAGCGGAGCTGGCCAGGGCGGTT
ACGGAGGCCCTGGTTCCCAAGGTGCTGGACAAGGAGCTGGAGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGAGCTG

GACAAGGCGGTTACGGAGGCTTGGGTGGACAGGGAGCTGGAAGAGGCGGTGCTGCCGCTGCCGCTGCCG
CTGCCGCTGTGGCTGGACAAGGTGGTCTGGGTTCGCAGGGTGCTGGAAGAGGTGGACTCGGCGGTGAGG
GTGCAGGCGCTGCCGCTGCCGCTGGAGGCGCCGGACAGGGTGGATACGGTGGTCTGGGACAAGGTGCTG
GTCAAGGAGCTGGAGTCGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGAGGCGCTGGCCAAGGTGGATACGGCGGTTTCG
GTTCCCAGGGAGCAGGAAGAGGTGGTCAAGGTGGACAAGGTTCGGCCGCTGCCGCTGGCGGTGCTGGGC
AAAGAGGTTACGGAGGCCAGGGTGCTGGTCAAGGTGGATTGGGCGGTGGAGAACAGGGAGCTGGCGAAG
AAGGTTCTGGTGCCAGCGCTGGCGCTGGTGCCGCTGCCGGAAGAGGCGCTGGCGGTGGAGGCAAGGGTG
GACTGGGCGGTCAAGGTGGTAGTGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGAGCTGGGCAAGGCGGTTTGGGAG
GCTCAAGAGGTGCTGGACAAGGTGCTGGAGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGAGCTGGTCAAGGCGGTT
ATGGAGGCTGGGCTCACAAGGAGCTGGTAGAGGTGGACAAGGCGCTGGTGCTGCCGCTGCCGCTGCCG
GCGGTGCTGGCCAAGGTGGTTACGGTGGACTGGGCGGTGAGGCGTTGGTAGAGGTGGTCTGGGTGGTC
AAGGTGCAGGTGCTGCCGCTGCCGCTCGGTGCTGGACAGGCGGTTACGGAGGCGTGGGATCTGGTGCTT
CGGCTGCCAGTGCTGCCAGATCTAGATTGTGAGTCCTCAAGCTTCATCTAGAGTGAGCTCCGCTGTTT
CGAACCTCGTCGCCAGTGGTCCAACAAATTCAGCTGCCCTGTGAGTACTATTTCAAACGTGGTTTCTC
AAATAGGAGCTTCTAATCCTGGACTGAGCGGCTGCGACGTTTTTGATACAGGCTCTGTTGGAAGTCGTGT
CAGCCTTGATCCAAATTCCTCGGTTTCATCTAGCATCGGACAGGTCAATTACGGCTCAGCGGGACAGGCTA
CGCAAATAGTGGGACAGTCAGTCTACCAGGCTTTAGGATAAATAAGAACTGTAAATAATGTATATATAT
AATTATATAAAAGATATATATAACCATATACAAACATATATATCATTATAAGACAATCTACCTATATAA
AAACAGACTAAAATTAATAATTATGTATACTTTAATTGTGTTTAGGACATTTTATGCAAATTGTGTTTG
CGTTAGGATTTTTTTTTGGAAGTTTTTTAGATTATTTATGAATATATAAATAAATATACGTTAATATAAT
ATATATTATATAAATCAACGACACGGCTTTTCATTTTGGTGATGATCAATCTTATTGTTCTTCTAATTG
ATTTTTTTGTACAATAAAGATGTATCCAGTTTTCCAGATAAAGAATTTAGTTTGTATTCTGGCCCCA
TTAAAATAAGTACGGTATTCGACAATAGCATGC

[0046] SEQ ID NO: 2 (lightF)

[0047] ATGAAACCTATCTTCCTCGTTCTG

[0048] SEQ ID NO: 3 (lightR)

[0049] TCCTAAAGCCTGGTAGACTGACTG

[0050] SEQ ID NO: 4(qc-F)

[0051] AGAGTGAGCTCCGCTGTTTC
[0052] SEQ ID NO: 5 (qc-R)
[0053] TCAAGGCTGACACGACTTCC
[0054] SEQ ID NO: 6 eIF4-1
[0055] GAATGGACCCTGGGACACTT
[0056] SEQ ID NO: 7 eIF4-2
[0057] CTGACTGGGCTTGAGCGATA。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，包括下列步骤：
- (1) 将FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段克隆进pFAST-Bac-Dual的多克隆位点构建质粒pFAST-FibL-MaSp-c；所述FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段的序列为SEQ ID NO: 1；
- (2) 将质粒pFAST-FibL-MaSp-c转化含有AcBacmid DH10Ac大肠杆菌，后涂布于LB琼脂培养基平板上培养，再挑取白色菌落，提取重组AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA；
- (3) 将重组AcBacmid-FibL-MaSp-c DNA转染草地夜蛾培养细胞，然后培养至细胞发病，然后取细胞培养上清再次接种培养细胞，然后培养至细胞发病，再收集细胞培养上清，离心纯化得到重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒粒子AcNPV-FibL-MaSp-c；
- (4) 将步骤(3)收集的细胞培养上清或者重组苜蓿银纹夜蛾杆状病毒粒子AcNPV-FibL-MaSp-c接种家蚕幼虫，然后饲养至上簇；然后营茧、采茧、缂丝，得到嵌合蚕丝。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，LB琼脂培养基含有四环素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG 和X-gal。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，步骤(2)中，培养的温度为37℃。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，步骤(3)中，培养细胞为Sf9培养细胞，培养的温度为26~27℃。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，家蚕幼虫为5龄家蚕幼虫。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，饲养至见熟蚕，然后用蜕皮激素处理，

再上簇。

- [权利要求 7] 根据权利要求6所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，家蚕幼虫饲养至见熟蚕过程中，采用抗生素处理一次。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法，其特征在于，25℃环境下营茧，7天后采茧。
- [权利要求 9] 根据权利要求1所述通过苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒用家蚕生产嵌合蚕丝的方法生产的嵌合蚕丝。
- [权利要求 10] 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒与FibL-MaSp-c-polyA_{FibL}片段在家蚕生产嵌合蚕丝中的应用。

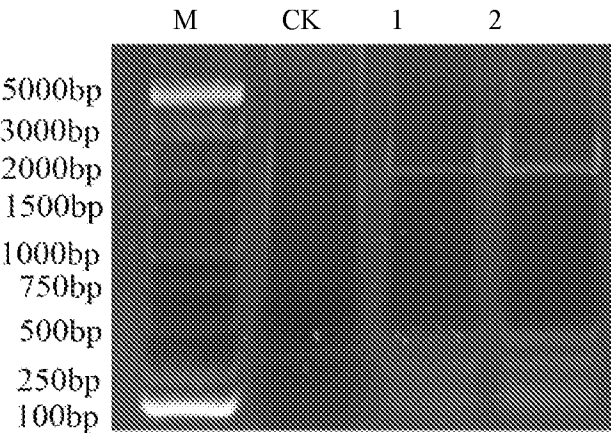


图 1

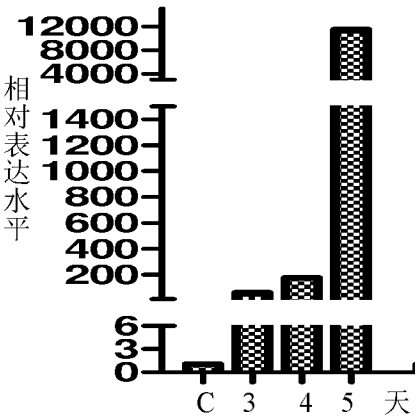


图 2

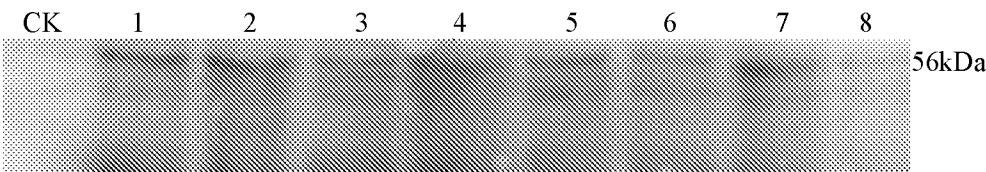


图 3

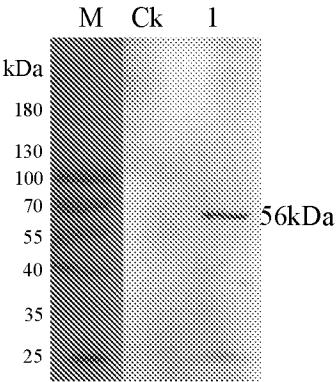


图 4

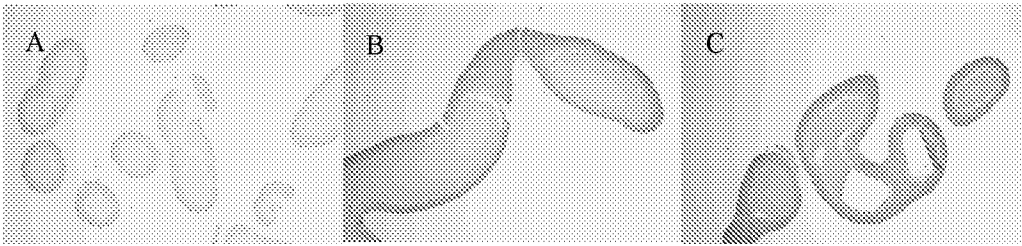


图 5

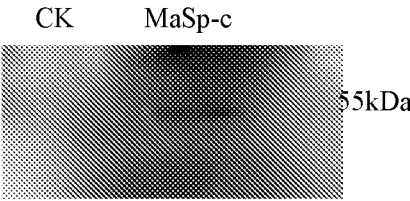


图 6

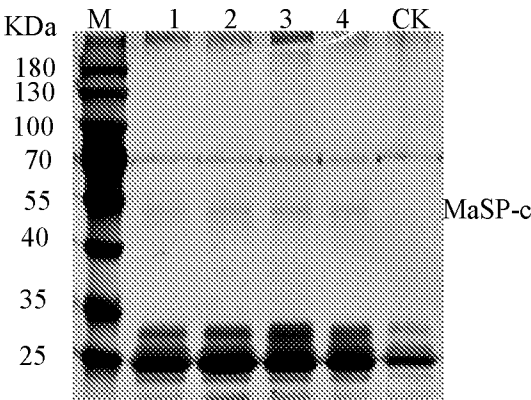


图 7

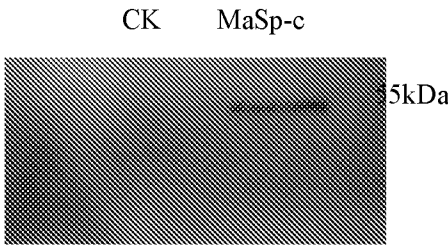


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/866(2006.01)i; A01K67/033(2006.01)i; C07K19/00(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, A01K, C07K

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)

CNXT, DWPL, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒, 家蚕, 嵌合, 蚕丝, 蚕丝蛋白, 轻链, 启动子, 金丝织网蜘蛛, 大壶状腺丝蛋白, 主壶腹线丝, 索引丝, 拖牵丝, Autographa californica nuclearpolyhedrosis virus, AcNPV, silk, worm, Bombyx, fibroin, FibL, major ampullatespidroin, MaSp, light chain; GenBank+; EMBL+; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 对SEQ ID NO: 1的序列检索, search for SEQ ID NO: 1.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114957485 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 30 August 2022 (2022-08-30) see claims 1-10, SEQ ID NO: 1, and description, paragraph 11	1-10
A	CN 109071619 A (SPIBER INC.; KOJIMA INDUSTRIES CORP.) 21 December 2018 (2018-12-21) see claims 1-34, and description, paragraph 178	1-10
A	CN 1362520 A (CHENGDU TIANYOU DEVELOPMENT CO., LTD.) 07 August 2002 (2002-08-07) see abstract, and claims 1-4	1-10
A	US 2013212718 A1 (FRASER MALCOLM JAMES; LEWIS RANDY; JARVIS DON; THOMPSON KIMBERLY; HULL JOSEPH; MIAO YUN-GEN; TEULE FLORENCE; SOHN BONGHEE; KIM YOUNGSOO;) 15 August 2013 (2013-08-15) see claims 1-30	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
 “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

30 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/CN2022/105424

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	刘辉芬 等 (LIU, Huifen et al.). "蜘蛛拖牵丝蛋白基因转家蚕表达质粒的构建 (Construction of Silkworm Transgenic Spider Dragging Silk Gene Expression Vector)" <i>湖南大学学报 (JOURNAL OF HUNAN UNIVERSITY)</i> , Vol. 33, No. 5, 25 May 2006 (2006-05-25), ISSN: 1000-2472, pages 105-109, and see abstract	1-10
A	M Yamao et al. "Gene Targeting in the Silkworm by Use of a Baculovirus" <i>Genes Development</i> , Vol. 13, No. 5, 01 March 1999 (1999-03-01), ISSN: 0890-9369, pages 511-516, and see abstract	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/105424

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/CN2022/105424

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114957485	A	30 August 2022	None			
CN	109071619	A	21 December 2018	KR	20190003583	A	09 January 2019
				EP	3450452	A1	06 March 2019
				EP	3450452	A4	06 March 2019
				EP	3450452	B1	06 March 2019
				AU	2017257942	A1	23 August 2018
				BR	112018067899	A2	24 April 2019
				US	2019135880	A1	09 May 2019
				JPWO	2017188434	A1	26 July 2018
				JP	6736802	B2	26 July 2018
				WO	2017188434	A1	02 November 2017
				RU	2018135566	A	28 May 2020
				CA	3012821	A1	02 November 2017
CN	1362520	A	07 August 2002	US	2002137211	A1	26 September 2002
				US	6872869	B2	26 September 2002
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	07 August 2013
				EP	2621957	B1	07 August 2013
				US	2019106467	A1	11 April 2019
				CA	2812791	A1	19 April 2012
				CA	2812791	C	19 April 2012
				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	03 March 2017
				AU	2011314072	A1	23 May 2013
				AU	2011314072	B2	23 May 2013
				WO	2012050919	A2	19 April 2012
				WO	2012050919	A3	19 April 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 December 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/105424

A. 主题的分类

C12N15/866(2006.01)i; A01K67/033(2006.01)i; C07K19/00(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, A01K, C07K

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))

CNXTX, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED; 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒, 家蚕, 嵌合, 蚕丝, 蚕丝蛋白, 轻链, 启动子, 金丝织网蜘蛛, 大壶状腺丝蛋白, 主壶腹线丝, 索引丝, 拖牵丝, Autographa californica nuclearpolyhedrosis virus, AcNPV, silk, worm, Bombyx, fibroin, FibL, major ampullatespidroin, MaSp, light chain; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NO:1的序列检索。

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 114957485 A (苏州大学) 2022年8月30日 (2022 - 08 - 30) 参见权利要求1-10, SEQ ID NO: 1, 说明书第11段	1-10
A	CN 109071619 A (丝芭博株式会社 小岛冲压工业株式会社) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 参见权利要求1-34, 说明书第178段	1-10
A	CN 1362520 A (成都天友发展有限公司) 2002年8月7日 (2002 - 08 - 07) 参见摘要, 权利要求1-4	1-10
A	US 2013212718 A1 (FRASER MALCOLM JAMES; LEWIS RANDY; JARVIS DON; THOMPSON KIMBERLY; HULL JOSEPH; MIAO YUN-GEN; TEULE FLORENCE; SOHN BONGHEE; KIM YOUNGS00;) 2013年8月15日 (2013 - 08 - 15) 参见权利要求1-30	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

“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30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

李振鹏

电话号码 (+86) 010-62411085

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	刘辉芬 等. “蜘蛛拖牵丝蛋白基因转家蚕表达质粒的构建” 湖南大学学报, 第33卷, 第5期, 2006年5月25日 (2006 - 05 - 25), ISSN: 1000-2472, 第105-109页, 参见摘要	1-10
A	M Yamao 等. “Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus” Genes Dev, 第13卷, 第5期, 1999年3月1日 (1999 - 03 - 01), ISSN: 0890-9369, 第511-516页, 参见摘要	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;
- 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/CN2022/105424

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	114957485	A	2022年8月30日	无			
CN	109071619	A	2018年12月21日	KR	20190003583	A	2019年1月9日
				EP	3450452	A1	2019年3月6日
				EP	3450452	A4	2019年3月6日
				EP	3450452	B1	2019年3月6日
				AU	2017257942	A1	2018年8月23日
				BR	112018067899	A2	2019年4月24日
				US	2019135880	A1	2019年5月9日
				JPWO	2017188434	A1	2018年7月26日
				JP	6736802	B2	2018年7月26日
				WO	2017188434	A1	2017年11月2日
				RU	2018135566	A	2020年5月28日
				CA	3012821	A1	2017年11月2日
CN	1362520	A	2002年8月7日	US	2002137211	A1	2002年9月26日
				US	6872869	B2	2002年9月26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	2013年8月7日
				EP	2621957	B1	2013年8月7日
				US	2019106467	A1	2019年4月11日
				CA	2812791	A1	2012年4月19日
				CA	2812791	C	2012年4月19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	2017年3月3日
				AU	2011314072	A1	2013年5月23日
				AU	2011314072	B2	2013年5月23日
				WO	2012050919	A2	2012年4月19日
				WO	2012050919	A3	2012年4月19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	2018年12月7日