



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110856493 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 25

(21) 申请号 201810948204.6

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2018.08.20

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103992956 A, 2014.08.20

申请公布号 CN 110856493 A

CN 1379683 A, 2002.11.13

CN 105707126 A, 2016.06.29

(43) 申请公布日 2020.03.03

CN 105420264 A, 2016.03.23

(73) 专利权人 中国烟草总公司黑龙江省公司牡丹江烟草科学研究所

CN 104152487 A, 2014.11.19

CN 103484384 A, 2014.01.01

地址 150000 黑龙江省哈尔滨市道里区哈药路17号

KR 20160025750 A, 2016.03.09

专利权人 山东农业大学

梁婉婉等. 腐植酸在植物保护领域的应用研究进展.《腐植酸》.2015, (第5期), 第9-14、20页.

(72) 发明人 刘永中 李向东 姜瀚林 郭兆奎 耿超 田延平 万秀清 李现道 乔婵 李若

Zhang, Cheng-Ling et, al. Molecular variability of Tobacco vein banding mosaic virus populations.《VIRUS RESEARCH》.2011, 第158卷(第1-2期), 第188-198页.

(74) 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限公司 11223

审查员 张娜

代理人 另婧

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书8页

C12N 7/04 (2006.01)

序列表9页 附图3页

(54) 发明名称

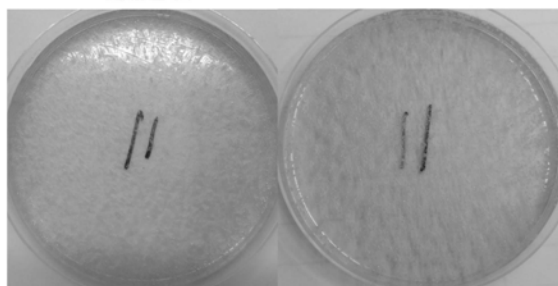
一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及农业科学领域,公开了一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用。植物病毒弱毒疫苗组合物包括携带植物病毒弱毒疫苗的发菌体、轻质碳酸钙、黄腐酸和黄原胶。携带植物病毒弱毒疫苗的发菌体与轻质碳酸钙的体积比为1:1。黄腐酸和黄原胶的添加量与发菌体和轻质碳酸钙混合物的关系为:每10ml发菌体和轻质碳酸钙混合物中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶。本发明的组合物和方法可以延长弱毒疫苗的保存时间,提高货架期,有利于弱毒疫苗的广泛应用,可以大大减少损失。

首次涂布菌落

第九周涂布菌落



1. 一种植物病毒弱毒疫苗组合物,其特征在于,植物病毒弱毒疫苗组合物包括携带植物病毒弱毒疫苗的发酵菌体、轻质碳酸钙、黄腐酸和黄原胶;

所述的植物病毒弱毒疫苗以TVBMV弱毒突变体为载体,TVBMV弱毒突变体中嵌入了可诱导对马铃薯X病毒、和/或马铃薯Y病毒、和/或黄瓜花叶病毒、和/或烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段;

所述的TVBMV弱毒突变体由pCamTVBMV在HC-Pro 序列中进行四个位点突变获得,所述的位点突变为:52位的精氨酸突变为谷氨酸,198位的天冬氨酸突变为赖氨酸;第250位的异亮氨酸突变为天冬氨酸,251位的谷氨酰胺突变为谷氨酸;

可诱导对马铃薯X病毒产生交叉保护的有效基因片段包括马铃薯X病毒的RdRp基因,其核苷酸序列如Seq ID No.13、或Seq ID No.14所示、或Seq ID No.15所示;

可诱导对马铃薯Y病毒产生交叉保护的有效基因片段包括PVY1片段和PVY2片段,PVY1片段的核苷酸序列如Seq ID No.20所示,PVY2片段的核苷酸序列如Seq ID No.21所示;

可诱导对黄瓜花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括黄瓜花叶病毒的2b基因,2b基因的核苷酸序列如Seq ID No.24所示;

可诱导对烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括烟草花叶病毒的TMV3片段, TMV3片段的核苷酸序列如Seq ID No.27所示。

2. 根据权利要求1所述的一种植物病毒弱毒疫苗组合物,其特征在于,携带植物病毒弱毒疫苗的发酵菌体与轻质碳酸钙的体积比为1:1。

3. 根据权利要求1所述的一种植物病毒弱毒疫苗组合物,其特征在于,所述的组合物中黄腐酸和黄原胶的质量比为1:1。

4. 根据权利要求1-3任一所述的一种植物病毒弱毒疫苗组合物,其特征在于,所述的黄腐酸和黄原胶的添加量与发酵菌体和轻质碳酸钙混合物的关系为:每10ml发酵菌体和轻质碳酸钙混合物中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶。

5. 根据权利要求1所述的一种植物病毒弱毒疫苗组合物,其特征在于,所述的发酵菌体包括农杆菌。

6. 一种延长植物病毒弱毒疫苗保存时间的方法,其特征在于,包括:

(1) 携带弱毒疫苗的发酵菌体经过离心浓缩后,加入轻质碳酸钙粉制成混合物粉剂;

(2) 在混合物粉剂中加入黄腐酸和黄原胶,制成植物病毒弱毒疫苗组合物,延长保存期;

所述的弱毒疫苗包括以TVBMV弱毒突变体为载体,TVBMV弱毒突变体中嵌入了可诱导对马铃薯X病毒、和/或马铃薯Y病毒、和/或黄瓜花叶病毒、和/或烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段;

所述的TVBMV弱毒突变体由pCamTVBMV在HC-Pro 序列中进行四个位点突变获得,所述的位点突变为:52位的精氨酸突变为谷氨酸,198位的天冬氨酸突变为赖氨酸;第250位的异亮氨酸突变为天冬氨酸,251位的谷氨酰胺突变为谷氨酸;

可诱导对马铃薯X病毒产生交叉保护的有效基因片段包括马铃薯X病毒的RdRp基因,其核苷酸序列如Seq ID No.13、或Seq ID No.14所示、或Seq ID No.15所示;

可诱导对马铃薯Y病毒产生交叉保护的有效基因片段包括PVY1片段和PVY2片段,PVY1片段的核苷酸序列如Seq ID No.20所示,PVY2片段的核苷酸序列如Seq ID No.21所示;

可诱导对黄瓜花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括黄瓜花叶病毒的2b基因,2b基因的核苷酸序列如Seq ID No.24所示;

可诱导对烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括烟草花叶病毒的TMV3片段, TMV3片段的核苷酸序列如Seq ID No.27所示。

7. 根据权利要求6所述的延长植物病毒弱毒疫苗保存时间的方法,其特征在于,携带植物病毒弱毒疫苗的发菌体与轻质碳酸钙的体积比为1:1。

8. 根据权利要求6所述的延长植物病毒弱毒疫苗保存时间的方法,其特征在于,黄腐酸和黄原胶的质量比为1:1。

9. 根据权利要求6所述的延长植物病毒弱毒疫苗保存时间的方法,其特征在于,所述的黄腐酸和黄原胶的添加量与发菌体和轻质碳酸钙混合物的关系为:每10ml发菌体和轻质碳酸钙混合物中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶。

10. 一种如权利要求1-5任一所述的组合物在延长植物病毒弱毒疫苗保存时间方面的应用。

一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及农业科学领域,具体地,本发明涉及一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用。

背景技术

[0002] 病毒病是农业生产中的重要病害之一,严重影响作物的产量和品质,造成巨大损失。目前市场上没有防治作物病毒病的特效药剂,因而作物病毒病的防治十分困难。交叉保护是防治植物病毒病的有效手段。随着技术的进步,现在可以构建病毒的侵染性克隆,通过反向遗传学技术筛选致病力显著下降、能保护作物免受强毒株系侵染的弱毒疫苗,在作物苗期提前接种,可有效防治病毒病。

[0003] 植物病毒弱毒疫苗需要利用农杆菌来进行生产,借助农杆菌来接种植物。但农杆菌常温下存活时间不长,经过一段时间后活菌数会大量下降,因而携带植物病毒弱毒疫苗的农杆菌不能长期保存,影响了植物病毒弱毒疫苗的广泛应用。

[0004] 有鉴于此特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于克服现有技术的不足,提供一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用。本发明通过使用轻质碳酸钙干燥携带弱毒疫苗的农杆菌体,并加入黄腐酸和黄原胶,可延长弱毒疫苗保存时间,提高货架期,有利于弱毒疫苗的广泛应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用技术方案的基本构思是:

[0007] 本发明的第一目的是提供一种植物病毒弱毒疫苗组合物,植物病毒弱毒疫苗组合物包括携带植物病毒弱毒疫苗的发菌体、轻质碳酸钙、黄腐酸和黄原胶。

[0008] 进一步的方案,携带植物病毒弱毒疫苗的发菌体与轻质碳酸钙的体积比为1:1。

[0009] 进一步的方案,所述的组合物中黄腐酸和黄原胶的质量比为1:1。

[0010] 进一步的方案,所述的黄腐酸和黄原胶的添加量与发菌体和轻质碳酸钙混合物的关系为:每10ml发菌体和轻质碳酸钙混合物中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶。

[0011] 本发明通过在携带植物病毒弱毒疫苗的农杆菌体中加入黄腐酸和黄原胶,证明能有效延长保存期,进而通过不同浓度梯度的筛选最终确定每10ml轻质碳酸钙粉剂加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶的配方比例保存效果最好,可将植物病毒弱毒疫苗的保存期延长2个月以上。

[0012] 进一步的方案,所述的植物病毒弱毒疫苗包括抗马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒、黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒中至少一种的弱毒疫苗。

[0013] 进一步的方案,所述的植物病毒弱毒疫苗包括以TVBMV弱毒突变体为载体,TVBMV弱毒突变体中嵌入了可诱导对马铃薯X病毒、和/或马铃薯Y病毒、和/或黄瓜花叶病毒、和/或烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段;

[0014] 或者,所述的植物病毒弱毒疫苗包括马铃薯X病毒、和/或马铃薯Y病毒、和/或黄瓜花叶病毒、和/或烟草花叶病毒突变的弱毒毒株;

[0015] 优选的,所述的植物病毒弱毒疫苗包括马铃薯Y病毒突变弱毒毒株,HC-Pro第182位的K突变为R。

[0016] 进一步的方案,可诱导对马铃薯X病毒产生交叉保护的有效基因片段包括马铃薯X病毒的RdRp基因,其核苷酸序列如Seq ID No.13、或Seq ID No.14所示、或Seq ID No.15所示;

[0017] 或者,可诱导对马铃薯Y病毒产生交叉保护的有效基因片段包括PVY1片段和PVY2片段,PVY1片段的核苷酸序列如Seq ID No.20所示,PVY2片段的核苷酸序列如Seq ID No.21所示;

[0018] 或者,可诱导对黄瓜花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括黄瓜花叶病毒的2b基因,2b基因的核苷酸序列如Seq ID No.24所示;

[0019] 或者,可诱导对烟草花叶病毒产生交叉保护的有效基因片段包括烟草花叶病毒的TMV3片段,TMV3片段的核苷酸序列如Seq ID No.27所示。

[0020] 进一步的方案,所述的发酵菌体包括农杆菌。

[0021] 本发明的第二目的是提供一种延长植物病毒弱毒疫苗保存时间的方法,包括:

[0022] (1)携带弱毒疫苗的发酵菌体经过离心浓缩后,加入轻质碳酸钙粉制成混合物粉剂;

[0023] (2)在混合物粉剂中加入黄腐酸和黄原胶,制成植物病毒弱毒疫苗组合物,延长保存期;

[0024] 优选的,携带植物病毒弱毒疫苗的发酵菌体与轻质碳酸钙的体积比为1:1;

[0025] 优选的,黄腐酸和黄原胶的质量比为1:1;

[0026] 优选的,所述的黄腐酸和黄原胶的添加量与发酵菌体和轻质碳酸钙混合物的关系为:每10ml发酵菌体和轻质碳酸钙混合物中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶。

[0027] 本发明的第三目的是提供一种如上所述的组合物,或者如上所述的方法在延长植物病毒弱毒疫苗保存时间方面的应用。

[0028] 本发明实施的具体技术方案是:

[0029] a.粉剂处理测试:将携带植物病毒弱毒疫苗的农杆菌分为两组,一组不处理,一组离心收集菌体并加入等体积的轻质碳酸钙混匀成粉剂。分别取20 μ L菌液和20 μ L粉剂,稀释5倍后涂布LB平板;活菌数分别为14785/100 μ L和14645/100 μ L,证明轻质碳酸钙处理对细菌活性没有影响。

[0030] b.黄腐酸和黄原胶工作浓度优化:分别设置不同浓度黄腐酸和黄原胶的对照组,室温静置保存。

[0031] c.疫苗保存情况观察:每组取100 μ L粉剂,加重悬液重悬涂布LB平板并观察菌落生长状况。

[0032] 采用上述技术方案后,本发明与现有技术相比具有以下有益效果。

[0033] 1、本发明的植物病毒弱毒疫苗组合物,通过使用轻质碳酸钙干燥携带弱毒疫苗的农杆菌体,并加入黄腐酸和黄原胶,可延长弱毒疫苗保存时间,提高货架期,有利于弱毒疫苗的广泛应用。

[0034] 2、本发明的植物病毒弱毒疫苗的保存方法中,离心收集携带植物病毒弱毒疫苗的菌体并使用轻质碳酸钙混匀成混合物粉剂后,每10ml混合物粉剂中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶的配方比例保存效果最好,可将植物病毒弱毒疫苗的保存期延长2个月以上。

[0035] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的描述。

附图说明

[0036] 附图作为本发明的一部分,用来提供对本发明的进一步的理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,但不构成对本发明的不当限定。显然,下面描述中的附图仅仅是一些实施例,对于本领域普通技术人员来说,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他附图。在附图中:

[0037] 图1为TVBMV基因组片段扩增示意图;

[0038] 图2为pCamTVBMV基因组结构示意图;

[0039] 图3分别取20 μ L菌液和20 μ L粉剂,稀释5倍后涂布LB平板;

[0040] 图4不同添加量比例的黄腐酸和黄原胶的弱毒疫苗组合物在保存九周后通过涂布LB平板观察保存效果;

[0041] 图5保存九周后LB平板统计菌落数;

[0042] 图6是每10ml混合物粉剂中添加黄腐酸和黄原胶各50mg时,首次涂布和第九周涂布后菌落生长对比。

[0043] 需要说明的是,这些附图和文字描述并不旨在以任何方式限制本发明的构思范围,而是通过参考特定实施例为本领域技术人员说明本发明的概念。

具体实施方式

[0044] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0045] 实施例一多位点TVBMV弱毒突变体的构建

[0046] 1、烟草脉带花叶病毒侵染性克隆的构建

[0047] 以烟草脉带花叶病毒的RNA为模板,用随机引物进行反转录。根据现有烟草脉带花叶病毒全基因组的限制性酶切图谱,可分三部分扩增,酶切后装配为TVBMV全长cDNA克隆。首先,通过Overlap-PCR将35S启动子融合到TVBMV5'非翻译区到HC-pro基因Nru I酶切位点这一片段的上游,发明人将该片段命名为p35S-HC;PCR扩增HC-pro基因Nru I酶切位点到6K2Xho I酶切位点之间的这一片段,发明人将该片段命名为pHC-6K2;PCR扩增6K2Xho I酶切位点到poy(A)尾巴这一片段,发明人将该片段命名为p6K2-polyA(如图1所示)。

[0048] cDNA合成所用反转录酶为Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Promega);以植物总RNA为模板,以随机引物为反转录引物进行反转录。

[0049] 以所得反转录产物为模板和相应的引物进行PCR扩增。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳。切胶回收后获得p35S-HC₂₁₁₀,pHC₂₁₁₁-6K2₆₀₇₅和p6K2₆₀₇₆-polyA三个片段,将三个片段连接后用SbfI和Sma I双酶切后0.8%琼脂糖凝胶电泳,回收,连接到农杆菌介导的表达载体pCambia0390,发明人将该策略构建的侵染性克隆命名为pCamTVBMV(如图2所示)。

[0050] 2、TVBMV弱毒突变体的构建

[0051] 获得烟草脉带花叶病毒侵染性克隆后,通过在HC-Pro序列中关键位点进行突变,获得TVBMV弱毒突变体,具体方法如下:

[0052] 设计突变引物,根据Liu等(2008)的方法,对烟草脉带花叶病毒HC-Pro的保守氨基酸位点进行定点突变,突变的引物名称及序列如表1中所示。

[0053] 表1TVBMV HC-Pro突变引物名称及序列

序号	序列 (5'-3')	名称	Seq ID Number
1	TGCCTTGCTGTGAAATAACATGCATTCAATGCGCAAAT	EITC-F	Seq ID No. 1
2	GTTATTTACAGCAAGGCATTAAGATTGACATATAATA CCAGCCAC	EITC-R	Seq ID No. 2
[0054] 3	AATGTGCAAGAACCAATTGGATGCAAATGGCAATTC	D198K-F	Seq ID No. 3
4	AATTGGTTCTTGACATTAAGAGGGGTTGATGTGAGC	D198K-R	Seq ID No. 4
5	TTAGCGGACGAAAACCTTGATTCTCCCGCGGAATTTG	I250DQ25 1E-F	Seq ID No. 5
6	AAGTTTTCGTCCGCTAACTTCCGGGAGCCATTCG	I250DQ25 1E-R	Seq ID No. 6

[0055] 其中,引物1和引物2定点突变HC-Pro氨基酸序列的52位氨基酸,由精氨酸突变为谷氨酸;引物3和引物4定点突变HC-Pro氨基酸序列的198位氨基酸,由天冬氨酸突变为赖氨酸;引物5和引物6定点突变HC-Pro氨基酸序列的250位和251位氨基酸,第250位的异亮氨酸突变为天冬氨酸,251位的谷氨酰胺突变为谷氨酸。

[0056] 用pCamTVBMV为模板,PCR突变体系:5×PCR Buffer 10μL,dNTP(10mM) 1μL,突变引物F(10μM) 1μL,突变引物R(10μM) 1μL,模板质粒10ng,Phusion DNA聚合酶0.3μL,ddH₂O补齐到50μL。

[0057] PCR突变程序:98℃/30sec;98℃/10sec,Tmno+3℃/20sec,72℃/5min,20个循环;98℃/10sec;Tmpp/20sec;72℃/15min;4℃保存。

[0058] 突变PCR结束后,每一个反应体系加入1μL Dpn I,充分混匀后,于37℃消解4h。

[0059] PCR反应体系用Dpn I处理完后,加入125μL无水乙醇(2.5×体积)和5μL 3M NaAc pH8.0,混匀后沉淀过夜;12000r/min,10min,弃上清;1mL 75%乙醇洗涤沉淀,弃上清;干燥沉淀,10μL ddH₂O溶解沉淀。

[0060] 突变沉淀产物转化大肠杆菌,将转化后的菌体均匀涂在含有X-gal和IPTG的Amp抗生素的LB平板上,挑选单菌落进行培养,提取质粒进行测序,测序正确则获得四个位点突变的TVBMV弱毒突变体。

[0061] 3、TVBMV弱毒突变体致病力研究

[0062] 将获得的突变质粒转入农杆菌中,经菌落PCR验证后,获得重组菌。然后挑单斑接种于含有卡那霉素(50μg/mL)、利福霉素(50μg/mL)、四环素(50μg/mL)的液体LB培养基中。取500μL菌液加至5mL含10mmol/L 2-(N-吗啉)-乙基磺酸(MES)和20μmol/L乙酰丁香酮(AS)及上述三种抗生素的LB培养基中,28℃振荡培养至对数生长期。

[0063] 离心收集菌体并重新悬浮于10mmol/L MgCl₂,10mmol/L MES,150μmol/L AS中,调

整浓度使其OD₆₀₀为0.5左右,室温静置3小时。取5mL一次性注射器,去掉针头吸取农杆菌菌液,从普通烟草(5-6周龄或4-6片真叶)叶片背面浸润。每株浸润2片叶。浸润的植株置于23℃光照培养箱中培养(16小时光照/8小时黑暗交替)。

[0064] 选取多株6周左右的普通烟NC89,接种TVBMV弱毒突变体,接种15天后发现烟草没有表现出症状。说明该TVBMV弱毒突变体在接种植物后不会引起可见症状,不会由蚜虫传播,使用安全。

[0065] 实施例二马铃薯X病毒相关基因片段的扩增及弱毒疫苗的构建

[0066] 1、马铃薯X病毒相关基因片段的扩增

[0067] 以PVX-1985基因组为模板,利用RT-PCR进行扩增各基因片段。本发明所提供的实施例,均按照常规实验条件,其中所采用的引物序列如下表:

[0068] 表2PVX基因片段扩增引物序列

编号	序列(5'-3')	Seq ID Number
1	GCTCTAGAGCCACCACTTGCTTCTCAGACA	Seq ID No.7
2	CTTAATTAACAAAGGGATGGTGGCAGGACTTC	Seq ID No.8
3	GCTCTAGAGACCTACTTAGAGCCAGAGACTACGG	Seq ID No.9
4	CTTAATTAAGTACATCACATTTCGACTACACACTTGG	Seq ID No.10
5	GCTCTAGAA ATGGTATTCTCAAGTCGCAGTGG	Seq ID No.11
6	CTTAATTAAGAAAGTTTCTGAGGCGGGGA	Seq ID No.12

[0070] 其中引物1和2应用于扩增PVX的Rd1区域,引物3和4应用于扩增PVX的Rd2区域,引物5和6应用于扩增PVX的Rd3区域,扩增获得的Rd1基因的核苷酸序列如Seq ID No.13所示,Rd2基因的核苷酸序列如Seq ID No.14所示,Rd3基因的核苷酸序列如Seq ID No.15所示。

[0071] 以PVX-1985为模板,利用RT-PCR进行扩增其各基因片段,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶(Finnzymes)。

[0072] 2、弱毒疫苗的构建

[0073] 回收的各基因的目的片段和TVBMV弱毒突变体,分别用Xba I和Pac I进行双酶切。TVBMV弱毒突变体和基因片段的连接,酶切产物经凝胶回收后,按照载体与片段分子数的比例(1:3-1:10)进行连接。转化大肠杆菌DH5α,连接后质粒经测序验证,获得嵌合体病毒。

[0074] 实施例三马铃薯Y病毒相关基因片段的扩增及弱毒疫苗的构建

[0075] 1、马铃薯Y病毒相关基因片段的扩增

[0076] 以PVY的cDNA基因组为模板,利用RT-PCR进行扩增各基因片段。本发明所提供的实施例,均按照常规实验条件,其中所采用的引物序列如下表:

[0077] 表3PVY基因片段扩增引物序列

编号	序列(5'-3')	Seq ID Number
1	GCTCTAGAGCCACCACTTGCTTCTCAGACA	Seq ID No.16
2	CTTAATTAACAAAGGGATGGTGGCAGGACTTC	Seq ID No.17
3	GCTCTAGAGACCTACTTAGAGCCAGAGACTACGG	Seq ID No.18
4	CTTAATTAAGTACATCACATTTCGACTACACACTTGG	Seq ID No.19

[0079] 其中引物1和2应用于扩增PVY1基因片段,引物3和4应用于扩增PVY 2基因片段。扩增获得的PVY1基因片段的核苷酸序列如Seq ID No.20所示,PVY 2基因片段的核苷酸序列

如Seq ID No.21所示。

[0080] 以PVY的cDNA为模板,利用PCR进行扩增,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶。反应结束,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,紫外灯下切取目的胶条并使用EasyPure Quick Gel Extraction Kit试剂盒回收PCR产物。

[0081] 2、载体构建

[0082] 使用烟草脉带花叶病毒弱毒突变体pCamTVBMV1的多克隆位点中PacI和XbaI两个酶切位点,分别酶切载体和片段。酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,回收并用T4DNA连接酶,4℃下静置8h进行连接。将连接产物转化E.coli DH5 α 感受态细胞,测序验证菌落并摇床培养菌体,提取质粒载体,得到3个单联弱毒疫苗,分别命名为pCamTVBMV1-PVY1、pCamTVBMV1-PVY2。

[0083] 实施例四黄瓜花叶病毒相关基因片段的扩增及弱毒疫苗的构建

[0084] 1、黄瓜花叶病毒相关基因片段的扩增

[0085] 以CMV-QZ基因组为模板,利用RT-PCR进行扩增各基因片段。本发明所提供的实施例,均按照常规实验条件,其中所采用的引物序列如下表:

[0086] 表4CMV基因片段扩增引物序列

编号	序列 (5'-3')	Seq ID Number
1	GCTCTAGAGAATTGAACGAAGGCGCAA	Seq ID No. 22
2	CTTAATTAATCAGACTCTGACAATCCCAC	Seq ID No. 23

[0089] 其中,引物1和2应用于扩增CMV的2b区域,扩增获得的2b基因的核苷酸序列如Seq ID No.24所示。以CMV-QZ为模板,利用RT-PCR进行扩增其各基因片段,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶(Finnzymes)。利用PCR进行扩增,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶。反应结束,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,紫外灯下切取目的胶条并使用EasyPure Quick Gel Extraction Kit试剂盒回收PCR产物。

[0090] 2、弱毒疫苗的构建

[0091] 回收的各基因的目的片段和TVBMV弱毒突变体,分别用Xba I和Pac I进行双酶切。TVBMV弱毒突变体和基因片段的连接,酶切产物经凝胶回收后,按照载体与片段分子数的比例(1:3-1:10)进行连接。连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,连接后质粒经测序验证,获得嵌合体病毒,也就是弱毒疫苗。

[0092] 实施例五烟草花叶病毒相关基因片段的扩增及弱毒疫苗的构建

[0093] 1、烟草花叶病毒相关基因片段的扩增

[0094] 以TMV的cDNA基因组为模板,利用RT-PCR进行扩增各基因片段。本发明所提供的实施例,均按照常规实验条件,其中所采用的引物序列如下表:

[0095] 表5TMV基因片段扩增引物序列

编号	序列 (5'-3')	Seq ID Number
1	CATCACCATCACTTAATTAACAGCACCATGATGAATAA TTTTG	Seq ID No. 25
2	AACTTCCTCGGTACCTCTAGACTGCTTTTCTAACCACCT ATTGAG	Seq ID No. 26

[0097] 其中引物1和2应用于扩增TMV 3基因片段。扩增获得的TMV3基因片段的核苷酸序列如Seq ID No.27所示。

[0098] 以TMV的cDNA为模板,利用PCR进行扩增,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶。反应结束,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,紫外灯下切取目的胶条并使用EasyPure Quick Gel Extraction Kit试剂盒回收PCR产物。

[0099] 2、载体构建

[0100] 使用烟草脉带花叶病毒弱毒突变体pCamTVBMV1的多克隆位点中PacI和XbaI两个酶切位点,分别酶切载体和片段。酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,回收并用T4DNA连接酶,4℃下静置8h进行连接。将连接产物转化E.coli DH5 α 感受态细胞,测序验证菌落并摇床培养菌体,提取质粒载体,得到单联弱毒疫苗,命名为pCamTVBMV1-TMV3。

[0101] 实施例六马铃薯Y病毒突变弱毒毒株

[0102] 以马铃薯Y病毒侵染性克隆pCamPVY^N为模板,利用PCR进行突变。本发明所提供的实施例,均按照常规实验条件,其中所采用的引物序列如下表:

[0103] 表6定点突变引物序列

编号	序列 (5'-3')	Seq ID Number
[0104] 1	TTAGGAATAGGCTATCTGCCAAAGCAAATTGGA	Seq ID No. 28
2	CAGATAGCCTATTCCTAAAGAACGAGATGTCTCCTTC	Seq ID No. 29

[0105] 其中引物1和2应用于将HC-Pro第182位的K突变为R。粗体字代表突变的核苷酸位点。突变前的HC-Pro的核苷酸序列如Seq ID No.30所示,氨基酸序列如Seq ID No.31所示。

[0106] 以马铃薯Y病毒侵染性克隆pCamPVY^N为模板,利用PCR进行突变,所用聚合酶为Phusion高保真聚合酶 (Finnzymes)。反应结束,在PCR产物中加入0.5 μ L DpnI (20U/ μ L), 37℃处理2h,加入125 μ L无水乙醇和5 μ L 3mol/L的醋酸钠 (pH=5.2) 混匀,-20℃沉淀过夜。13000r/min离心10min,弃上清,沉淀用1mL 75%乙醇洗涤后置于室温自然干燥,加入10 μ L ddH₂O水回溶,转化大肠杆菌DH5 α ,突变质粒经测序验证,获得的突变质粒命名为pCamPVY-K182R。

[0107] 实施例七弱毒疫苗转化农杆菌并制备弱毒疫苗组合物。

[0108] 将实施例二到实施例六中获得的各种弱毒疫苗转化农杆菌GV3101。经菌落PCR验证后,获得重组菌。然后挑单斑接种于含有卡那霉素 (50 μ g/mL)、利福霉素 (50 μ g/mL)、四环素 (50 μ g/mL) 的液体LB培养基中。取500 μ L菌液加至5mL含10mmol/L 2-(N-吗啉)-乙基磺酸 (MES) 和20 μ mol/L乙酰丁香酮 (AS) 及上述三种抗生素的LB培养基中,28℃振荡培养至对数生长期。

[0109] 然后离心收集菌体并在研钵中用等体积轻质碳酸钙混匀成混合物粉剂。

[0110] 分别取20 μ L菌液和20 μ L粉剂,稀释5倍后涂布LB平板;菌落生长情况如图3所示,菌液和粉剂涂布后,菌落的生长情况基本无差别,说明轻质碳酸钙干燥菌体不影响菌体的活性。

[0111] 然后在混合物粉剂中按照每10ml发酵菌体和轻质碳酸钙混合物粉剂中加入50mg黄腐酸和50mg黄原胶的量,制成植物病毒弱毒疫苗组合物。

[0112] 试验例

[0113] 以马铃薯X病毒弱毒疫苗组合物为例,取10ml发酵菌体和轻质碳酸钙混合物粉剂,分别加入如下11组不同梯度含量的黄腐酸和黄原胶,作为11个试验组,考察黄腐酸和黄原胶的添加量对组合物稳定期的影响。

[0114] 表7各试验组黄腐酸和黄原胶的添加量

试验组	黄腐酸/mg	黄原胶/mg
1	0	0
2	1000	0
3	100	0
4	50	0
5	10	0
6	0	1000
7	0	100
8	0	50
9	0	10
10	100	100
11	50	50

[0116] 试验组1-11的组合物在制备完成后,每组取100 μ L粉剂,加重悬液重悬首次涂布LB平板,于28 $^{\circ}$ C倒置培养48h后拍摄菌落形态图,并进行计数。

[0117] 然后在常温下放置两个月,第九周时每组取100 μ L粉剂,加重悬液重悬涂布LB平板,于28 $^{\circ}$ C倒置培养48h后拍摄菌落形态图,结果如图4所示,试验组11的菌落数最多。将菌落形态图导入电脑后用Photoshop处理,使用画笔模式点击每个菌落并用键鼠软件计数,结果如图5所示。

[0118] 第九周的菌落结果表明,试验组11中,10ml发酵菌体和轻质碳酸钙混合物粉剂中添加了50mg黄腐酸和50mg黄原胶处理的菌落数最多,为10228个/100 μ L。

[0119] 另外,将第九周涂布的试验组11的菌落形态图与首次涂布后的菌落形态图进行对比,结果如图6所示,常温放置两个月后,试验组11的菌落数与首次涂布的菌落数基本无差别(如图4所示),说明本发明的组合物和方法可以延长弱毒疫苗的保存时间,提高货架期,有利于弱毒疫苗的广泛应用,可以大大减少损失。

[0120] 以上所述仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专利的技术人员在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述提示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明方案的范围内。

	<110> 中国烟草总公司黑龙江省公司牡丹江烟草科学研究所 山东农业大学	
	<120> 一种植物病毒弱毒疫苗组合物、弱毒疫苗保存方法及其应用	
	<130> 20180810	
	<160> 31	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 1	
	tgcccttgctg tgaataaca tgcattcaat gcgcaaat	38
	<210> 2	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 2	
	gttattcac agcaaggcat taaagattga catataatac cagccac	47
	<210> 3	
[0001]	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 3	
	aatgtgcaag aaccaattgg atgcaaatgg caatttc	37
	<210> 4	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 4	
	aattggttct tgcacattaa agaggggttg atgtgagc	38
	<210> 5	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 5	
	ttagcggacg aaaactgat tctcccggg aatttg	36
	<210> 6	
	<211> 34	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 6	
	aagttttcgt ccgctaactt ccgggagcca ttcg	34
	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 7	
	gctctagagc caccacttgc ttctcagaca	30
	<210> 8	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 8	
	cttaattaac aaagggatgg tggcaggact tc	32
	<210> 9	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
[0002]	<400> 9	
	gctctagaga cctacttaga gccagagact acgg	34
	<210> 10	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 10	
	cttaattaag tacatcacat tcgcactaca cacttgg	37
	<210> 11	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 11	
	gctctagaaa tggatttcct caagtcgag tgg	33
	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 12	
	cttaattaataa agaaagtffc tgaggcgggg a	31

	<210> 13	
	<211> 957	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 X 病毒聚合酶 Rd1 基因 (RNA-dependent RNA polymerase Rd1)	
	<400> 13	
	gccaccactt gcttctcaga cacactttcc ggtggcttgc taacaaagac ccttgcacca	60
	gtgagggctt ggatacaaga gaaaaagatg caactgtttg gtcttgagga ctacgcgaag	120
	ttagtcaaag cagttgattt ccaccagtg gacttttctt tcaaagtgga aacttgggac	180
	ttcagattcc atcccttga agcatggaag gcctccgac caagggaaagt gtcggacgta	240
	gaggaaatgg aaagtttgtt ctcatgagg gacctgcttg attgcttcac aagaatgcca	300
	gcttatgcag tgaacgcaga ggaagattta gctgcaatca ggaaaacgcc tgagatggat	360
	gtcggtaag gaattaaaga acctgcagga gacagaaatc aatactcaaa ccctgcggaa	420
	accttctca acaagctcca caggaaacac agtagagagg tgaacatca gaccacaaag	480
	aaggctaagc gcctagctga aatccaggag tccatgagag cagaaggtga agctgaatca	540
	aatgagatga gcgggggcat gggggcaata ccgagcaacg ctgaacttcc cagcagcagt	600
	gatgctagac aagaactcac actccaacc accaaatctg ttcccgaag gtgggaagat	660
	gcttactca cagattccag tgtggaagag gagcaggtga agctccctgg aaaagaagct	720
[0003]	gttgagacag caatgcaaca agtcatcgaa ggactccctt ggaaactctg gattcctcaa	780
	ctaaacgctg ttggattcaa ggcgctagaa atcagaggg ataggaatgg aacaatgatc	840
	atgcctatca cagaaatggt ctccgggtg gaaaaagagg acttcccgga aggaactcca	900
	aaagattgg cagagaatt gctcgtatg aacagaagtc ctgccacat cctttg	957
	<210> 14	
	<211> 798	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 X 病毒聚合酶 Rd2 基因 (RNA-dependent RNA polymerase Rd2)	
	<400> 14	
	gacctactta gagccagaga ctacggcagt gatgtgaaga acaagagaat tgggtccatc	60
	acaaagacac aagcaacaag ttggggcgag tacttaacag gaaagataga aagcctgact	120
	gagaggaaag ttgcaactg tgcattcat ggagctggag gatctgggaa aagtcatgcc	180
	atccagaagg cattgagaga aattggtaag ggctcagaca tcaccgtagt cctgccgacc	240
	aatgaactgc ggctagattg gagtaagaaa gtgcccaaca ctgaaccata catgttcaag	300
	acctatgaaa aggcattaat tgggggaaca ggagctatag tcattcttga tgattactca	360
	aaacttctc ccggttcat agaagcctta atctgttct actccaaat caagctagtc	420
	attctaacag gagatagcag acagagcgtc taccatgaaa ctgctgagga cgctccatc	480
	aggcatttgg gaccagcagc agagtacttc tcaaaatact gccgatact tctcaatgcc	540
	acacaccgca acaagaaaga ccttgcgaac atgcttggcg tctacagtga gagaacaggg	600

	gttacagaaa tcagcatgag cgccgagttt ttagaaggaa tccaacttt agtgcctcg	660
	gatgaaaaga gaaagctgta catgggcacc ggaaggaatg acacgttcac atacgtgga	720
	tgccaagggc taaccaagcc gaaagtacaa attgtgttg accacaacac ccaagtgtg	780
	agtgcgaatg tgatgtac	798
	<210> 15	
	<211> 897	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 X 病毒聚合酶 Rd3 基因 (RNA-dependent RNA polymerase Rd3)	
	<400> 15	
	aagaaagttt ctgaggcggg gaagtgagac agtgcctctc cctgacttaa tcagtgtcct	60
	gcaagtgagt gtatgtgcct gacactgctt ctcatcgaac aagtcatgca gagagtcctt	120
	gtggcatag gcataactca aatcaatttc ataggaatct tgacatttct taagtgcgc	180
	cttagcttcg gccaatftta agctaactg aagcttgatt gggctttca ttacccttt	240
	tggtgtaac agccaaccac aaaactcagg ccaactgcct ttcttttgc gcgtgattac	300
	aggcttcgac ttgaggagta attgtcttc aagcctgtgg aaactaagct tcacttctgg	360
	aacgcaatcc agtgcctgag cgtctcctgc ataaactgg gcagttccgg ctgggatgc	420
	aaactttgta tgggtgtaag ctatgttga ctcagtgttt gcatcaaaag tgggacctc	480
	accagtcagg cgcataattg acaatgtgcc tagaaaaatc tgtgcattgg tcttaatgc	540
[0004]	tatgtatgct tggatgattt cctctggtat gcagtgggtc ttggctttga gtacctcaa	600
	ttgcagcata gctccatct gagattggtc gaaagccgta tagtcattag ccaaactagg	660
	cctgccaaaa ttccagttgt tcaaggccca tgcagacatg tcttctggcg tggttcaca	720
	gtttatgaag acttctttg gctggaaagc ctgctgaac catcgcatgt acctagccat	780
	agttccaaaa agcatcacag tctgctgata aaaagctgct atggtttgac ctggcttaat	840
	cttgggtaga cccagctttt ccacctttgt gaccactgc gacttgagga ataccat	897
	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 16	
	gctctagagc caccactgc ttctcagaca	30
	<210> 17	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 17	
	cttaattaac aaagggatgg tggcaggact tc	32
	<210> 18	

	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 18	
	gctctagaga cctacttaga gccagagact acgg	34
	<210> 19	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 19	
	cttaattaag tacatcacat tcgcactaca cacttg	37
	<210> 20	
	<211> 256	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 Y 病毒 PVY1 基因 (PVY1 8857-9112nt)	
	<400> 20	
	ggcatalcagac ataggagaaa ctgagatgcc aactgtgatg aatgggctta tggtttggtg	60
	cattgaaaaat ggaacctcgc caaatgtcaa cggagtttgg gttatgatgg atggggatga	120
	acaagtcgag taccggttga aaccaatcgt tgagaatgca aaaccaacce ttaggcaaat	180
[0005]	catggcacat ttctcagatg ttgcagaagc gtatatagaa atgcgcaaca aaaaggaacc	240
	atatatgcca cgatat	256
	<210> 21	
	<211> 271	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 Y 病毒 PVY2 基因 (PVY2 9091-9361nt)	
	<400> 21	
	ggaaccatat atgccacgat atggttfaat tcgaaatctg cgggatgtgg gtttagcgcg	60
	ttatgctttt gacttttatg aggtcacatc acgaacacca gtgagggcta gggaaagcga	120
	cattcaaatg aaggccgcag cattgaaatc agcccaacct cgacttttcg ggttggatgg	180
	tggcatcagt acacaagagg agaacacaga gaggcacacc accgaggatg tctctccaag	240
	tatgcatact ctacttgag ttaagaacat g	271
	<210> 22	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 22	
	gctctagaga attgaacgaa ggcgcaa	27
	<210> 23	

	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 23	
	cttaattaat cagactctga caatcccac	29
	<210> 24	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 黄瓜花叶病毒 RNA2b 基因(CMV RNA2b)	
	<400> 24	
	atggaattga acgaaggcgc aatgacaaac gtcgaactcc aactggctcg tatggtggag	60
	gccaagagggc agagacgaag gtctcacaag cagaatcgac gggaacgagg tcacaaaagt	120
	cccagcgaga gggcgcgttc aaatctcagg ctgttccgct tctaccatt ctatcaagtg	180
	gatggttcgg aactgataga gatgtaccac catgtgaaca tgggtgggalt gtcagagtct	240
	gaggccctt gttttacgtt gccagcggaa gaagaccatg atttcgacga tacggattgg	300
	ttcgtggtta acgagtgggc ggaagggctg ttctga	336
	<210> 25	
	<211> 43	
	<212> DNA	
[0006]	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 25	
	catcaccatc acttaattaa cagcaccatg atgaataatt ttg	43
	<210> 26	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 26	
	aacttctcgc gtacctctag actgcttttc taaccaccta ttgag	45
	<210> 27	
	<211> 367	
	<212> DNA	
	<213> 烟草花叶病毒基因组片段 3 (Tobacco mosaic virus, TMV3)	
	<400> 27	
	cagcaccatg atgaataatt ttgatgctgt taccatgagg ttgactgaca ttcatgaa	60
	tgcaaaagat tgcatattgg atatgtctaa gtctgttct ggcctaagg atcagatcaa	120
	accactaata cctatggtac gaacggcggc agaaatgcca cgccagactg gactattgga	180
	aaatttagtg gcgatgatta aaaggaactt caacgcaccc gagttgtctg gcatcattga	240
	tattgaaaat actgcatctt tagttglaga taagtitttc gatagttatt tgcttaaaga	300

	aaaaagaaaa ccaataaaaa atgtttcttt gttcagtaga gagtctctca ataggtggtt	360
	agaaaag	367
	<210> 28	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 28	
	ttaggaatag gctatctgcc aaagcaaatt ggaact	36
	<210> 29	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<400> 29	
	cagatagcct attcctaaag aacgagatgt ctcttttc	38
	<210> 30	
	<211> 1368	
	<212> DNA	
	<213> 马铃薯 Y 病毒辅助成分-蛋白酶基因 (Helper component-proteinase, HCpro)	
	<400> 30	
[0007]	tcaagcgtg aaagcttttg gaagggattg gacggcaatt gggcacaat gagatattct	60
	acagatcata catgtgtggc aggcttacca gttgaagact gtggcagagt tgcagcgata	120
	atgacacaca gtattttacc gtgctataag attacctgcc ctacctgtgc ccaacaatat	180
	gccaaactgc cagccagtga ctacttaag atattacaca agcacgcaag tgatggctca	240
	aatcgattgg gggcagacaa agatcgcttt gtgcatgtca aaaagtctt gacaatctta	300
	gagcacttaa ctgaaccggt tgatctgagt ctagaaatt tcaatgaagt attcaagtct	360
	ataggggaga agcaacaatc accttcaaa aacctgaata ttctgaataa ttctttttg	420
	aaaggaaagg aaaatacagc tcgtgaatgg caggtggctc aattaagctt acttgaattg	480
	gcaagattcc aaaagaacag aacggataat atcaagaaag gagacatctc gttctttagg	540
	aataaaactat ctgccaaagc aaattggaac ttgtatctgt catgtgataa ccagctggat	600
	aagaatgcaa gcttctctgtg gggacagagg gaatatcatg ctaagcgatt ttctcgaac	660
	tatttcgagg aaattgatcc agcgaagggc tattcagcat acgaaaatcg ttgcatccg	720
	aatgggacaa gaaaacttgc aattggaaac ctaattgtac cacttgatct ggctgagttt	780
	aggcgggaaga tgaaggtga ttataaaga cagccagggg tgagtaagaa gtgcacgagc	840
	tcgaaggatg gaaactacgt gtatccctgt tgttgacta cacttgatga tggctcagct	900
	gttgaatcaa cattttacc gccaaactaag aagcacctcg taataggtaa tagtggcgac	960
	caaaagtatg ttgacttacc aaaagggaat tctgagatgt tatatattgc caggcaaggc	1020
	ttctgttaca ttaacatttt cctcgcgatg ttgattaaca ttagtgagga agatgcaaag	1080

	gatttcacta agaaggttcg tgacatgtgt gtgccaaagc ttggaacctg gccaacctatg	1140
	atggatctgg ctacaacttg tgctcaaatg aaaatattct accctgatgt tcatgatgca	1200
	gaactgccta gaatactagt cgatcacgaa acgcagacat gccatgtagt tgactcgttt	1260
	ggctcacaaa caactgggta tcatatttg aaagcatcta gcgtgtccca acttatttg	1320
	tttgctaag atgagttgga gtctgacatt aagcactata gagttggt	1368
	<210> 31	
	<211> 456	
	<212> PRT	
	<213> 马铃薯 Y 病毒辅助成分蛋白酶 (Helper component-proteinase, HCpro)	
	<400> 31	
	Ser Ser Ala Glu Ser Phe Trp Lys Gly Leu Asp Gly Asn Trp Ala Gln	
	1 5 10 15	
	Met Arg Tyr Pro Thr Asp His Thr Cys Val Ala Gly Leu Pro Val Glu	
	20 25 30	
	Asp Cys Gly Arg Val Ala Ala Ile Met Thr His Ser Ile Leu Pro Cys	
	35 40 45	
	Tyr Lys Ile Thr Cys Pro Thr Cys Ala Gln Gln Tyr Ala Asn Leu Pro	
	50 55 60	
[0008]	Ala Ser Asp Leu Leu Lys Ile Leu His Lys His Ala Ser Asp Gly Leu	
	65 70 75 80	
	Asn Arg Leu Gly Ala Asp Lys Asp Arg Phe Val His Val Lys Lys Phe	
	85 90 95	
	Leu Thr Ile Leu Glu His Leu Thr Glu Pro Val Asp Leu Ser Leu Glu	
	100 105 110	
	Ile Phe Asn Glu Val Phe Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gln Gln Ser Pro	
	115 120 125	
	Phe Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Asn Phe Phe Leu Lys Gly Lys Glu	
	130 135 140	
	Asn Thr Ala Arg Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Ser Leu Leu Glu Leu	
	145 150 155 160	
	Ala Arg Phe Gln Lys Asn Arg Thr Asp Asn Ile Lys Lys Gly Asp Ile	
	165 170 175	
	Ser Phe Phe Arg Asn Lys Leu Ser Ala Lys Ala Asn Trp Asn Leu Tyr	
	180 185 190	
	Leu Ser Cys Asp Asn Gln Leu Asp Lys Asn Ala Ser Phe Leu Trp Gly	
	195 200 205	

Gln Arg Glu Tyr His Ala Lys Arg Phe Phe Ser Asn Tyr Phe Glu Glu
 210 215 220
 Ile Asp Pro Ala Lys Gly Tyr Ser Ala Tyr Glu Asn Arg Leu His Pro
 225 230 235 240
 Asn Gly Thr Arg Lys Leu Ala Ile Gly Asn Leu Ile Val Pro Leu Asp
 245 250 255
 Leu Ala Glu Phe Arg Arg Lys Met Lys Gly Asp Tyr Lys Arg Gln Pro
 260 265 270
 Gly Val Ser Lys Lys Cys Thr Ser Ser Lys Asp Gly Asn Tyr Val Tyr
 275 280 285
 Pro Cys Cys Cys Thr Thr Leu Asp Asp Gly Ser Ala Val Glu Ser Thr
 290 295 300
 Phe Tyr Pro Pro Thr Lys Lys His Leu Val Ile Gly Asn Ser Gly Asp
 305 310 315 320
 Gln Lys Tyr Val Asp Leu Pro Lys Gly Asn Ser Glu Met Leu Tyr Ile
 325 330 335
 [0009] Ala Arg Gln Gly Phe Cys Tyr Ile Asn Ile Phe Leu Ala Met Leu Ile
 340 345 350
 Asn Ile Ser Glu Glu Asp Ala Lys Asp Phe Thr Lys Lys Val Arg Asp
 355 360 365
 Met Cys Val Pro Lys Leu Gly Thr Trp Pro Thr Met Met Asp Leu Ala
 370 375 380
 Thr Thr Cys Ala Gln Met Lys Ile Phe Tyr Pro Asp Val His Asp Ala
 385 390 395 400
 Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Asp His Glu Thr Gln Thr Cys His Val
 405 410 415
 Val Asp Ser Phe Gly Ser Gln Thr Thr Gly Tyr His Ile Leu Lys Ala
 420 425 430
 Ser Ser Val Ser Gln Leu Ile Leu Phe Ala Asn Asp Glu Leu Glu Ser
 435 440 445
 Asp Ile Lys His Tyr Arg Val Gly
 450 455

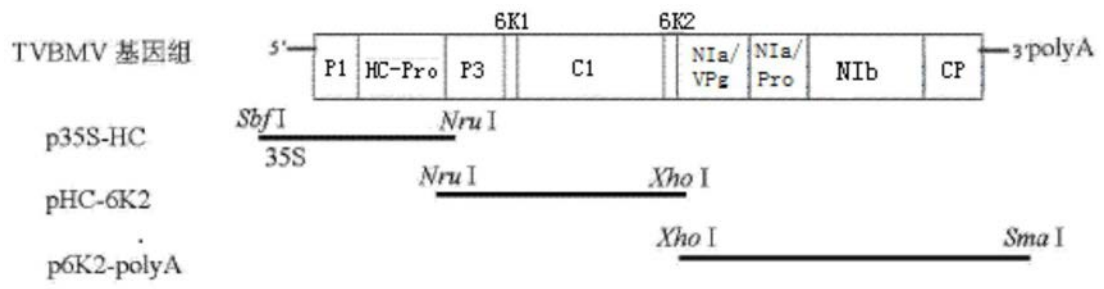


图1

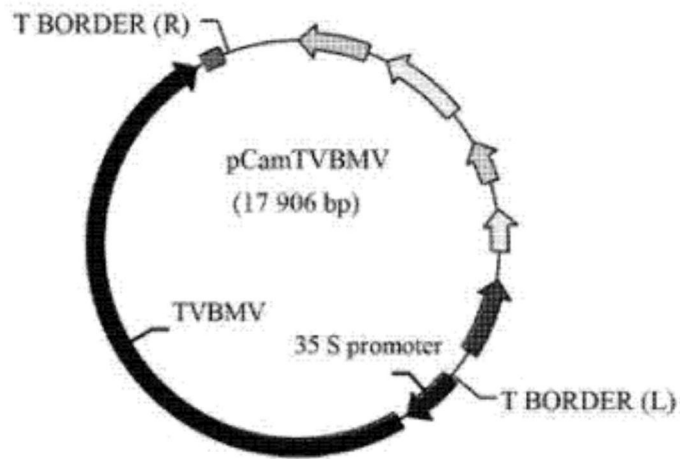


图2

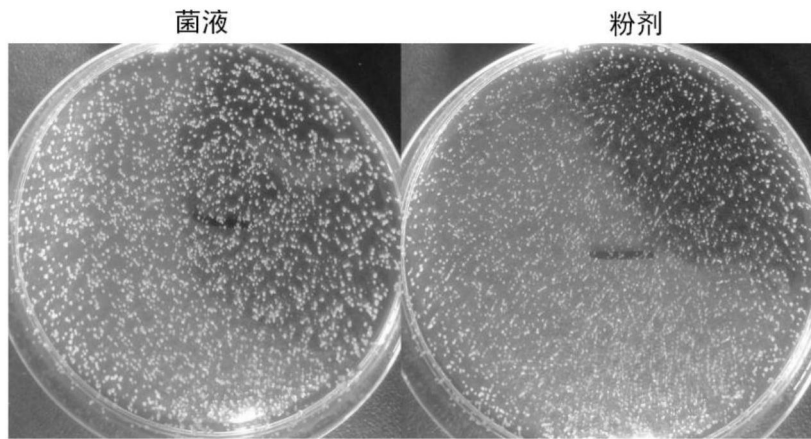


图3

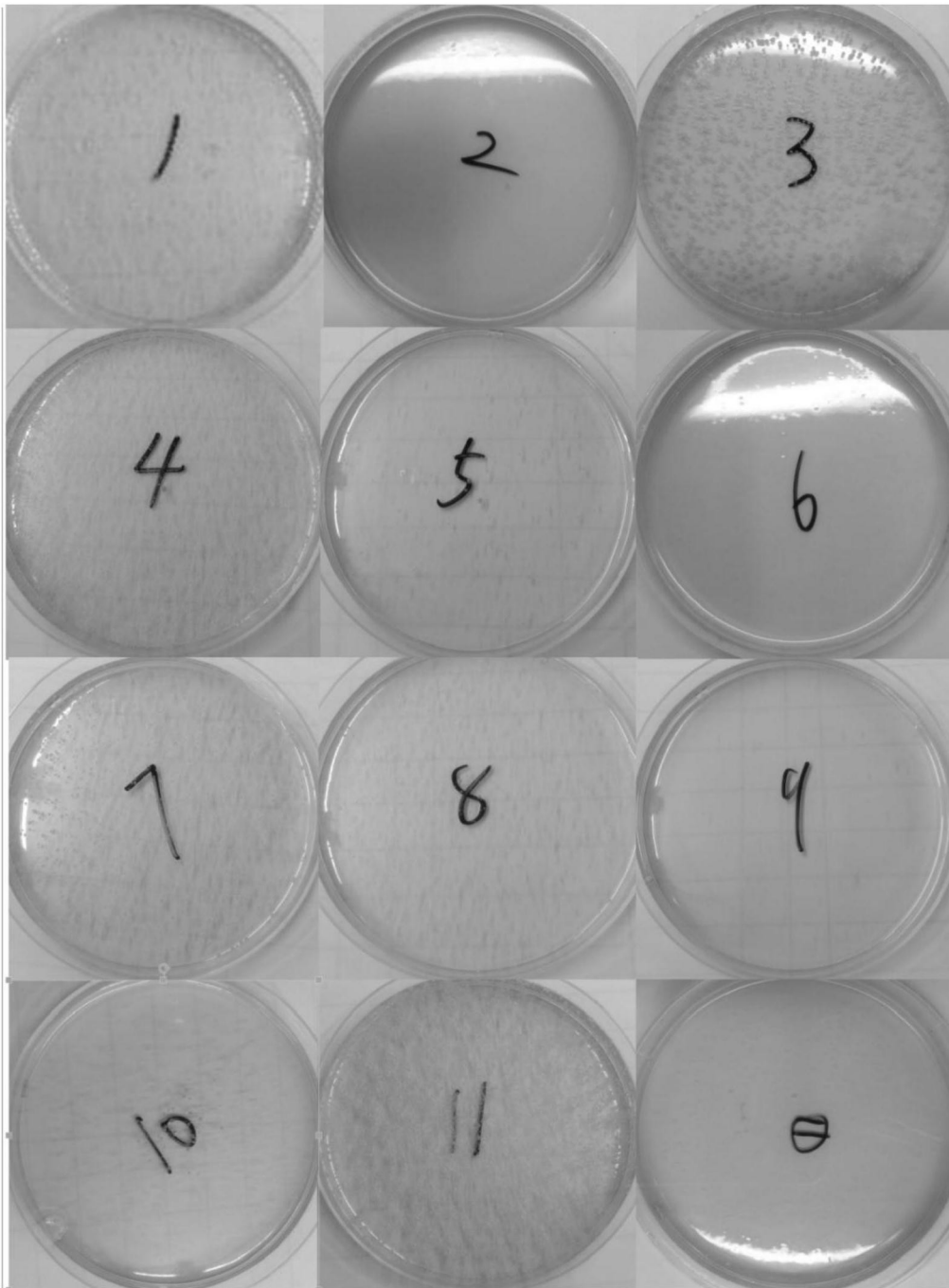


图4

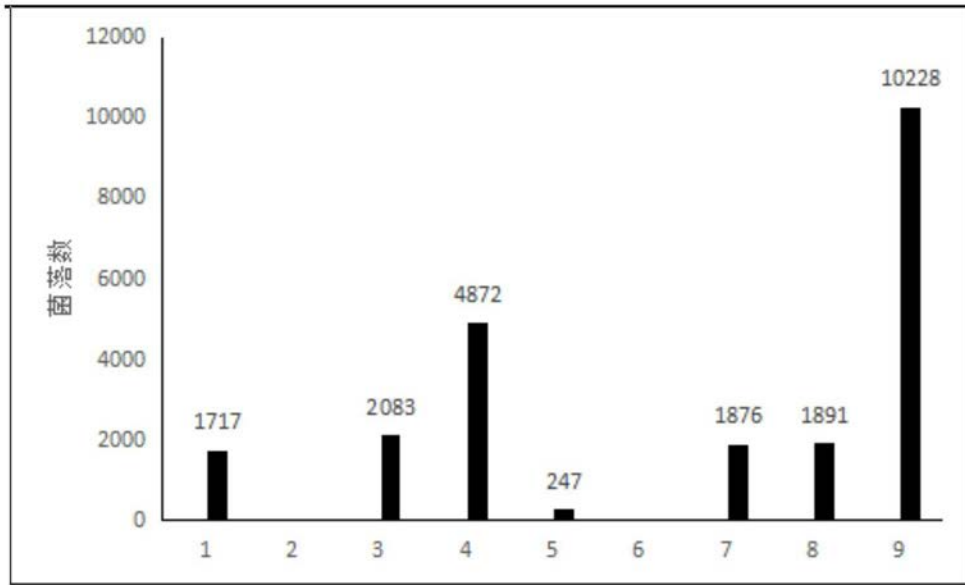


图5

首次涂布菌落

第九周涂布菌落

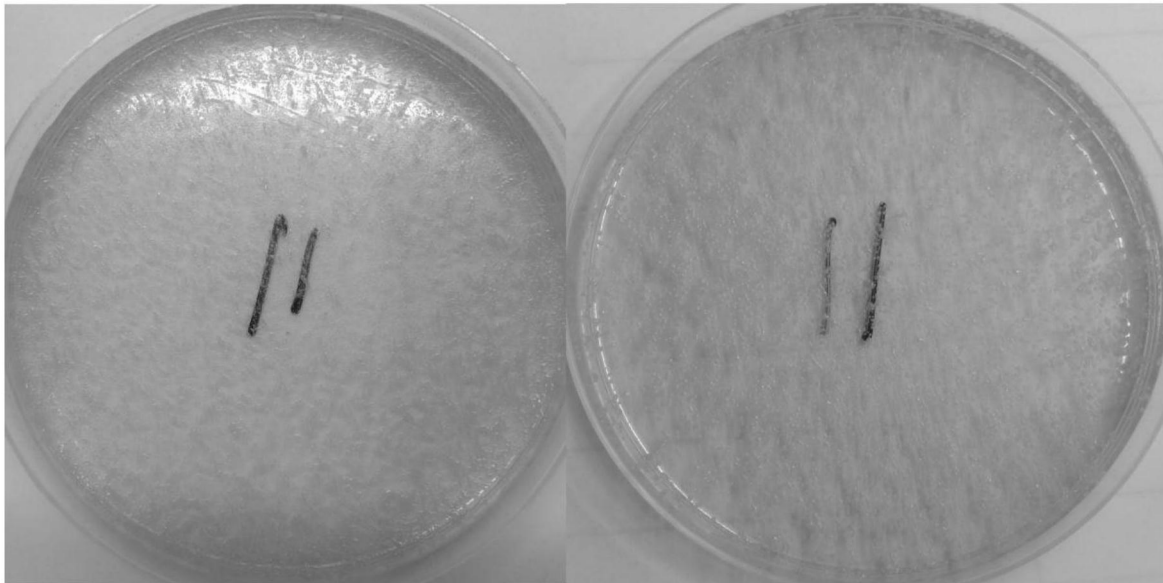


图6