



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115125250 A

(43) 申请公布日 2022. 09. 30

(21) 申请号 202210640527.5

(22) 申请日 2022.06.07

(71) 申请人 山东省农业科学院畜牧兽医研究所
地址 250100 山东省济南市历城区桑园路8号

(72) 发明人 齐静 姜丹丹 杜以军 吴香菊
隋超 李均同 丛晓燕

(74) 专利代理机构 北京索睿邦知识产权代理有限公司 11679

专利代理师 刘丽

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

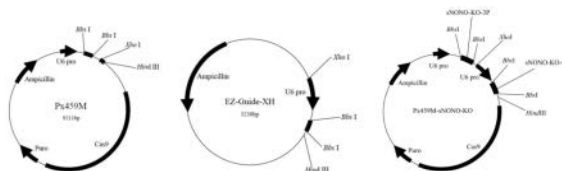
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

猪NONO蛋白敲除基因、相关质粒、细胞系及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学技术领域,特别涉及基因敲除质粒和细胞系,此细胞系感染PRV后,产生的IFN-β mRNA水平,相比于PAM-KNU细胞显著降低;此外,本细胞系促进PRV增殖,可以用于增殖PRV和PRV疫苗生产。



1. 猪NONO蛋白敲除基因,其特征在于核苷酸序列见序列表中序列2的核苷酸序列。
2. 根据权利要求1所述的猪NONO蛋白敲除基因,其特征在于与NONO蛋白核苷酸序列相比,450-966 bp间碱基缺失。
3. 一种猪NONO蛋白敲除基因相关质粒,含有序列表中序列1的核苷酸序列。
4. 根据权利要求3所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒,其特征在于在Px459M质粒的Hind III酶切位点以及距离Hind III酶切位点最远的Bbs I酶切位点之间插入的核苷酸序列见序列表中序列1的核苷酸序列。
5. 一种猪NONO蛋白敲除基因相关质粒的制备方法,其特征在于是通过以下步骤得到的:
 - (1) 设计两对引物,核苷酸序列如下:
sNONO-KO-3Fwd: 5' -CACCAGGAAGGTTTCGGACCGTAA-3' ,
sNONO-KO-3Rev: 5' -AAACTTACGGTCCGAAACCTTCCT-3' ,
sNONO-KO-4Fwd: 5' -CACCGGCGTCAAGAAGAACTTCGG-3' ,
sNONO-KO-4Rev: 5' -AAACCCGAAGTTCTTCTTGACGCC-3' ,
将引物sNONO-KO-3Fwd和sNONO-KO-3Rev进行磷酸化和退火,得到sNONO-KO-3P, 将引物sNONO-KO-4Fwd和sNONO-KO-4Rev进行磷酸化和退火,得到sNONO-KO-4P;
 - (2) 构建基因敲除质粒
使用Bbs I酶切质粒Px459M和EZ-Guide-XH,分别胶回收,得到载体片段1和载体片段2,将sNONO-KO-3P连接到载体片段1,得到Px459M-sNONO-KO-3P,将sNONO-KO-4P连接到载体片段2,得到EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,用Hind III/Xho I分别双酶切Px459M-sNONO-KO-3P和EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,得到载体片段3和基因片段4,将载体片段3和基因片段4连接,得到猪NONO蛋白敲除基因相关质粒Px459M-sNONO-KO。
6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于磷酸化和退火操作如下:反应体系中含sNONO-KO-3Fwd和sNONO-KO-3Rev或sNONO-KO-4Fwd和sNONO-KO-4Rev各10 $\mu\text{mol/L}$,10 \times T4 ligase buffer 1 μL ,T4 PNK 1 U,H₂O 6 μL ,共10 μL ;反应条件为:37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,PCR梯度降温至25 $^{\circ}\text{C}$,速度为每秒降低0.1 $^{\circ}\text{C}$,25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。
7. 一种猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系,权利要求5或6所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒转染PAM-KNU细胞,使用含有嘌呤霉素培养基筛选,存活的抗性细胞克隆即为猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系。
8. 一种权利要求1或2所述的猪NONO蛋白敲除基因、权利要求3或4所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒、权利要求7所述的猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系在制备疫苗中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于所述猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系感染PRV后,抑制IFN- β mRNA表达。
10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于所述细胞系促进PRV增殖。

猪NONO蛋白敲除基因、相关质粒、细胞系及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,特别涉及一种猪NONO蛋白敲除基因、相关质粒、细胞系及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 不包含POU结构域的八聚核苷酸结合蛋白(NONO, 也被称为P54^{nrb})是果蝇行为/人类剪接蛋白(DBHS)家族成员。人NONO基因编码471个氨基酸,其蛋白结构主要包含四个部分,N端串联的两个RNA识别基序(RRM1,RRM2),可识别RNA结合和剪接位点;C末端的卷曲螺旋结构域(Coiled coil),大约包含100个氨基酸;在RRM2和Coiled coil结构域之间存在一个保守结构域NOPS,包含52个氨基酸;在靠近C末端的位置存在一个螺旋-转角-螺旋(HTH)结构以及富含酸性/碱性氨基酸区域,这两个区域共同构成DNA结合域(DBD),能够结合双链DNA。

[0003] NONO蛋白是一种多功能蛋白,能够参与多种细胞内的生物学进程,NONO蛋白独立地或者协同其他转录因子,通过结合DNA或者RNA作用,参与转录调控以及mRNA的转运等过程;NONO蛋白可以通过结合RNA聚合酶II或者核酸外切酶等分子,调节mRNA的剪接;NONO蛋白的DNA结合结构域可以直接结合细胞核中损伤断裂的DNA,有助于双链DNA的精准和快速修复;在调节先天性免疫方面,NONO蛋白增强cGAS对于DNA的结合,促进IFN- β 的表达,抑制艾滋病毒的感染。

[0004] 目前关于猪NONO(sNONO)蛋白的报道较少,为了更加深入地研究其功能,尤其是sNONO对于抗病毒免疫的影响,有必要开发一种从猪细胞基因组中敲除sNONO基因的方法,为后续开展猪NONO蛋白的相关研究奠定基础。

发明内容

[0005] 为了更加深入地研究sNONO的相关功能,提供了一种从基因组中稳定敲除sNONO基因的基因敲除质粒Px459M-sNONO-KO和细胞系sNONO KO-PAM-KNU,为研究sNONO功能打下基础。

[0006] 本发明还提供了所述基因敲除质粒Px459M-sNONO-KO和细胞系sNONO KO-PAM-KNU的制备方法。

[0007] 本发明还提供了所述细胞系sNONO KO-PAM-KNU的应用。

[0008] 本发明是通过以下步骤得到的:

猪NONO蛋白敲除基因,核苷酸序列见序列表中序列2的核苷酸序列。

[0009] 所述的猪NONO蛋白敲除基因,与NONO蛋白核苷酸序列相比,450-966 bp间碱基缺失。

[0010] 一种猪NONO蛋白敲除基因相关质粒,含有序列表中序列1的核苷酸序列。

[0011] 所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒,在Px459M质粒的Hind III酶切位点以及距离Hind III酶切位点最远的Bbs I酶切位点之间插入的核苷酸序列见序列表中序列1的核

核苷酸序列。

[0012] 一种猪NONO蛋白敲除基因相关质粒的制备方法,是通过以下步骤得到的:

(1) 设计两对引物,核苷酸序列如下:

sNONO-KO-3Fwd: 5' -CACCAGGAAGGTTTCGGACCGTAA-3' ,

sNONO-KO-3Rev: 5' -AAACTTACGGTCCGAAACCTTCCT-3' ,

sNONO-KO-4Fwd: 5' -CACCGGCGTCAAGAAGAACTTCGG-3' ,

sNONO-KO-4Rev: 5' -AAACCCGAAGTTCTTCTTGACGCC-3' ,

将引物sNONO-KO-3Fwd和sNONO-KO-3Rev进行磷酸化和退火,得到sNONO-KO-3P,将引物sNONO-KO-4Fwd和sNONO-KO-4Rev进行磷酸化和退火,得到sNONO-KO-4P;

(2) 构建基因敲除质粒

使用*Bbs* I酶切质粒Px459M和EZ-Guide-XH,分别胶回收,得到载体片段1和载体片段2,将sNONO-KO-3P连接到载体片段1,得到Px459M-sNONO-KO-3P,将sNONO-KO-4P连接到载体片段2,得到EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,用*Hind* III/*Xho* I分别双酶切Px459M-sNONO-KO-3P和EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,得到载体片段3和基因片段4,将载体片段3和基因片段4连接,得到猪NONO蛋白敲除基因相关质粒Px459M-sNONO-KO。

[0013] 优化磷酸化和退火操作如下:反应体系中含sNONO-KO-3Fwd和sNONO-KO-3Rev或sNONO-KO-4Fwd和sNONO-KO-4Rev各10 μmol/L,10×T4 ligase buffer 1 μL,T4 PNK 1 U,H₂O 6 μL,共10 μL;反应条件为:37 °C 30 min,95 °C 5 min,PCR梯度降温至25 °C,速度为每秒降低0.1 °C,25 °C 5 min,4 °C 5 min。

[0014] 所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒转染PAM-KNU细胞,使用含有嘌呤霉素培养基筛选,存活的抗性细胞克隆即为猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系。

[0015] 所述的猪NONO蛋白敲除基因相关质粒、所述的猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系在制备疫苗中的应用。

[0016] 所述猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系感染PRV后,抑制IFN-β mRNA表达。

[0017] 所述猪NONO蛋白敲除基因相关细胞系促进PRV野生型以及疫苗株的增殖,并且能够应用于PRV疫苗生产。

[0018] 本发明的有益效果:

(1) 本发明构建的sNONO KO-PAM -KNU细胞系在感染PRV的条件下,明显降低IFN-β的表达水平,能够应用于猪NONO调节先天性免疫机制的研究;

(2) 通过PRV感染实验证明,在相同的条件下,本发明构建的sNONO KO-PAM -KNU细胞系比PAM-KNU细胞系更有利于PRV野生型以及疫苗株的增殖,所述细胞系可以应用于sNONO抗病毒作用研究以及PRV疫苗生产。

[0019] 附图说明:

图1为构建sNONO基因敲除细胞系的质粒图谱,左图为Px459M的质粒图谱;中图为EZ-Guide-XH的质粒图谱;右图为Px459M-sNONO-KO的质粒图谱;

图2为*Bbs* I酶切Px459M质粒的电泳图,酶切后所得的条带为载体片段1;

图3为*Bbs* I酶切EZ-Guide-XH质粒的电泳图,酶切后所得的条带为载体片段2;

图4为重组载体Px459M-sNONO-KO-3P和EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P的PCR鉴定图谱,其中400 bp左右的片段为Px459M-sNONO-KO-3P的PCR结果,而200 bp左右的片段为EZ-

Guide-XH-sNONO-KO-4P的PCR结果;

图5为Hind III/Xho I双酶切重组载体Px459M-sNONO-KO-3P和EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P的电泳图,其中载体片段3由Px459M-sNONO-KO-3P双酶切得到,而基因片段4由EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P双酶切得到;

图6为Px459M-sNONO-KO质粒的Hind III/Xho I的双酶切鉴定图谱;

图7为sNONO KO-PAM-KNU细胞系的鉴定,其中PAM-KNU细胞系扩增sNONO全长的PCR结果为1413 bp;而sNONO KO-PAM-KNU细胞系扩增sNONO全长的PCR结果为853 bp;

图8为sNONO KO-PAM-KNU细胞系sNONO基因的测序结果,swine NONO为PAM-KNU细胞系NONO基因序列;swine NONO KO为sNONO KO-PAM-KNU细胞系NONO基因序列;

图9为PRV SD1404分别感染sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞系,检测两种细胞中IFN-β的表达水平;

图10为PRV SD1404分别感染sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞系,在确定的时间点分别取样,测定PRV的滴度;

图11为PRV Bartha-K61疫苗毒株分别感染sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞系,在确定的时间点分别取样,测定PRV的滴度。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本申请的技术方案进行具体说明。

[0021] 实施例1:猪NONO基因敲除质粒Px459M-sNONO-KO的构建

1.1 引物设计

设计两对引物,分别为sNONO-KO-3Fwd/sNONO-KO-3Rev和sNONO-KO-4Fwd/sNONO-KO-4Rev,引物的5'端带有Bbs I酶切后的核苷酸序列,序列如下:

sNONO-KO-3Fwd: 5'-CACCAGGAAGGTTTCGGACCGTAA-3',

sNONO-KO-3Rev: 5'-AAACTTACGGTCCGAAACCTTCCT-3',

sNONO-KO-4Fwd: 5'-CACCGCGTCAAGAAGAACTTCGG-3',

sNONO-KO-4Rev: 5'-AAACCCGAAGTTCTTCTTGACGCC-3',

两对向导RNA对于sNONO基因的两个外显子区域同时发生编辑,编辑后基因转录成的mRNA上,相对于正常的NONO mRNA减少500 bp左右。

[0022] 1.2 引物的磷酸化与退火

将引物sNONO-KO-3Fwd/sNONO-KO-3Rev和sNONO-KO-4Fwd/sNONO-KO-4Rev稀释到100 μM,两对引物分别进行磷酸化和退火,得到sNONO-KO-3P和sNONO-KO-4P。反应体系为10 μL,含sNONO-KO-3Fwd/sNONO-KO-3Rev和sNONO-KO-4Fwd/sNONO-KO-4Rev各10 μM,10×T4 ligase buffer 1 μL,T4 PNK 1 U,H₂O 6 μL。反应条件为:37 °C 30 min,95 °C 5 min,PCR梯度降温至25 °C,速度为每秒降低0.1 °C,25 °C 5 min,4 °C 5 min。

[0023] 1.3 基因敲除质粒的构建与鉴定

基因敲除质粒Px459M和EZ-Guide-XH的质粒图谱见图1,使用Bbs I酶切质粒Px459M和EZ-Guide-XH,分别胶回收,得到载体片段1和载体片段2,结果见图2和图3,将sNONO-KO-3P连接到载体片段1,得到Px459M-sNONO-KO-3P,将sNONO-KO-4P连接到载体片段2,得到EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,转化DH5α感受态细菌,37 °C过夜培养,挑取单菌落于氨

苜青霉素抗性的LB培养基中,37 °C过夜振摇培养,提取质粒,Px459M-sNONO-KO-3P使用sNONO-KO-3Fwd和CAG-R进行PCR鉴定,CAG-R引物序列如下:

CAG-R: 5' -GTACTGGGCACAATGCCAG-3'

EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P使用sNONO-KO-4Fwd和M13F通用引物(5' -TGTA AACGACGGCCAGT-3')进行PCR鉴定,结果见图4。鉴定结果为阳性的质粒交由青岛擎科公司测序,用DNastar软件进行序列分析。用Hind III/Xho I分别双酶切Px459M-sNONO-KO-3P和EZ-Guide-XH-sNONO-KO-4P,得到载体片段3和基因片段4,结果见图5,将基因片段4连接到载体片段3上,得到的连接产物转化DH5 α 感受态细菌,37 °C过夜培养,挑取单菌落于氨苄青霉素抗性的LB培养基中,37 °C过夜振摇培养,提取质粒,使用Hind III/Xho I进行双酶切鉴定,结果见图6,然后交由青岛擎科公司测序,用DNastar软件进行序列分析,得到Px459M-sNONO-KO质粒,质粒图谱见图1,质粒当中插入的序列见序列1。

[0024] 实施例2:猪NONO基因敲除细胞系sNONO KO-PAM-KNU的构建

2.1 PAM-KNU细胞嘌呤霉素耐受性的测试

消化PAM-KNU细胞,用细胞培养基稀释,使其密度为 1×10^4 个细胞/mL,按照每孔1 mL的量,接种至12孔细胞培养板上,于含5% CO₂、37 °C的培养箱中过夜培养。第二天进行细胞耐受性测试,使用的嘌呤霉素浓度为:1、2、4、6、8和10 μ g/mL。筛选到第4天时,引起细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度作为PAM-KNU细胞进行单克隆筛选的最佳药物作用浓度。本发明筛选的最佳嘌呤霉素作用浓度为4 μ g/mL。

[0025] 2.2 基因敲除质粒Px459M-sNONO-KO转染PAM-KNU细胞

消化PAM-KNU细胞,使用细胞培养基稀释至 1×10^4 个细胞/mL并接种于12孔细胞培养板上,于细胞培养箱中培养过夜后,按照Lipofectamine[®] 3000(Invitrogen)说明书进行转染操作,在灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 °C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入2 μ L P3000和1 μ g的重组质粒Px459M-sNONO-KO,轻轻混匀;在另一个灭菌的1.5 mL的离心管中先加入37 °C预热的OPTI-MEM无血清培养基50 μ L,然后加入3 μ L Lipofectamine[®] 3000转染试剂,轻轻混匀,将两个1.5 mL离心管中的试剂混合均匀,室温孵育10 min,然后加入到待转染细胞的培养基中,放入细胞培养箱继续培养。同时设置未转染的细胞做对照。

[0026] 2.3 sNONO KO-PAM-KNU细胞系的筛选

转染24小时后,使用含有4 μ g/mL嘌呤霉素的细胞培养基筛选细胞。筛选到第4天时,未转染的对照组细胞全部死亡,转染Px459M-sNONO-KO的PAM-KNU细胞出现存活的抗性细胞克隆。将抗性细胞中的筛选培养基弃掉,换成正常的细胞培养基继续培养,挑取细胞克隆,按照有限稀释法对细胞进行稀释,然后接种于96孔细胞培养板中,使得每个孔细胞数量约为1个,置于细胞培养箱中培养,待细胞长满单层后,将96孔板中的细胞进行消化,分别扩大培养至24孔板中,等到细胞长满单层后,对细胞进行消化并从每个孔中取出50%的细胞进行鉴定,剩余的细胞继续培养。鉴定为阳性的细胞系扩大培养,命名为sNONO KO-PAM-KNU细胞系。

[0027] 实施例3:sNONO KO-PAM-KNU细胞系的鉴定

3.1 PCR鉴定

将从24孔板中取出的细胞和作为对照的PAM-KNU细胞提取RNA并反转录成cDNA,以

反转录的cDNA为模板,用扩增sNONO基因序列的引物进行PCR鉴定,引物序列如下:

sNONO-Fwd: 5' -ATGCAGAGCAATAAAACT-3'

sNONO-Rev: 5' -TTAGTATCGGCGACGTTTGTGGGA-3'

PCR反应体系为25 μ L,含cDNA 1 μ L, dNTP 200 μ mol/L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,sNONO-Fwd和sNONO-Rev各400 nmol/L, TaKaRa TaqTM 0.25 U。反应条件为:预变性95 $^{\circ}$ C 5 min;然后进行35个循环,循环条件为95 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min;然后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min,PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,结果见图7,筛选到的阳性sNONO KO-PAM-KNU细胞的电泳条带在896 bp,而PAM-KNU细胞的电泳条带在1413 bp。

[0028] 3.2 基因测序鉴定

将上述步骤中电泳大小在896 bp的条带进行凝胶回收,回收产物交由青岛擎科公司测序,结果见图8,核苷酸序列见序列表中序列2。与NONO基因序列(见序列表中序列3)对比,发现在450-966 bp之间出现了碱基缺失。

[0029] 实施例4:sNONO KO-PAM-KNU细胞系的应用

4.1 sNONO对于PRV诱导的IFN- β 表达水平的影响

消化sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞,接种到12孔细胞培养板上培养至细胞长满单层,感染1个MOI的PRV,分别于3 h、6 h、9 h、12 h收取细胞,用TRIzol试剂提取总RNA,使用Takara的PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser试剂盒进行反转录,合成cDNA,使用sIFN- β 和 β -actin引物进行实时荧光定量PCR分析,引物序列如下:

sIFN- β -F:5' -TGCATCCTCCAAATCGCTCT-3'

sIFN- β -R:5' -ATTGAGGAGTCCCAGGCAAC-3'

s β -actin-F:5' -TCTGGCACCACACCTTCT-3'

s β -actin-R:5' -GATCTGGGTCATCTTCTCAC-3'

结果如图9,可以发现感染PRV后,sNONO KO-PAM-KNU中IFN- β mRNA的水平比PAM-KNU细胞中显著降低,证明sNONO KO-PAM-KNU可以应用于sNONO调控先天性免疫的相关研究。

[0030] 4.2 sNONO KO-PAM-KNU细胞在增殖PRV中的应用

将sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞接种到12孔板中,待细胞长满单层,感染1个MOI的PRV野生型毒株PRV SD1404,分别于3 h、6 h、9 h、12 h收取上清液100 μ L,在PK-15细胞上测定每个时间点PRV的TCID₅₀,结果见图10,发现相比于PAM-KNU细胞,PRV SD1404在sNONO KO-PAM-KNU细胞上具有更强的增殖能力,所以sNONO KO-PAM-KNU细胞系可以应用于增殖PRV方面的相关研究。

[0031] 4.3 sNONO KO-PAM-KNU细胞在疫苗生产中的应用

将sNONO KO-PAM-KNU和PAM-KNU细胞接种到12孔板中,待细胞长满单层,感染1个MOI的PRV Barthar-K61疫苗株,分别于3 h、6 h、9 h、12 h收取上清液100 μ L,在PK-15细胞上测定每个时间点TCID₅₀,结果见图11,发现相比于PAM-KNU细胞,PRV Barthar-K61株在sNONO KO-PAM-KNU细胞上具有更强的增殖能力,所以sNONO KO-PAM-KNU细胞系可以应用于PRV的疫苗生产。

[0032] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受实施例的限制,其它任何未背离本发明的精神实质与原理下所做的改变、修饰、组合、替代、简化均应为

等效替换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 山东省农业科学院 畜牧兽医研究所

<120> 猪NONO蛋白敲除基因、相关质粒、细胞系及制备方法和应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 565

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

```
caccaggaag gtttcggacc gtaagtttta gagctagaaa tagcaagtta aaataaggct 60
agtccgttat caacttgaaa aagtggcacc gagtcggtgc ttttttgttt tagagctaga 120
aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt tttagcgcgt gcgccaattc tgcagacaaa 180
tggtcttaga gtcgacacta gtctcgagga gggcctatth cccatgattc cttcatatth 240
gcatatacga tacaaggctg ttagagagat aattggaatt aatttgactg taaacacaaa 300
gatattagta caaaatacgt gacgtagaaa gtaataatth cttgggtagt ttgcagttth 360
aaaattatgt tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atthtcgatt 420
cttggcttta tatacttgt ggaaaggacg aaacaccggc gtcaagaaga acttcgggtt 480
ttagagctag aaatagcaag ttaaaataag gctagtccgt tatcaacttg aaaaagtggc 540
accgagtcgg tgctttttta agctt 565
```

<210> 1

<211> 896

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

```
atgcagagca ataaaactth taacttggag aagcaaaacc aactccaag gaaacatcat 60
cagcatcacc atcagcagca ccaccagcag caacagcagc agccaccgcc tccaccaata 120
cctgcaaacg ggcagcaagc cagcagccag aatgaaggct taactattga cctgaagaat 180
tttagaaac caggagagaa gaccttacc caacgtagcc ggctctthgt gggcaatctt 240
cctcctgaca tcaactgagga ggaaatgagg aaactatthg agaaatacgg gaaggcaggc 300
gaagtcttca ttcacaagga taaaggctth ggctthtacc gcttggaac acgaacccta 360
gcggagattg ccaaagtgga actggacaac atgccactcc gtggaaagca gctgcgtgtg 420
cgctthgcct gccatagtgc atcccttacc ggaggatgga agagctgcat aaccaagaag 480
tgcaaaaacg aaagcagttg gagctcagac aggaggagga acgcaggcgc cgtgaggaag 540
agatgcggcg gcagcaagaa gaaatgatgc ggcgacagca ggaaggattc aagggaacct 600
tcctgatgc gagagagcag gagatacggg tgggccagat ggctatggga ggtgctatgg 660
gcataaacia cagaggcgc atgccccctg ctctgtgcc agctgttaca ccagctctc 720
caggacctgc cactatgatg ccagatggaa ccttgggatt gacccacca acaactgaac 780
```

gctttggcca agctgctaca atggaaggaa ttggggcaat tgggtgaacc cctccagcat 840
 tcaaccgtgc agctcctgga gctgaatttg ctccaaacaa acgtcgccga tactaa 896
 <210> 1
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <400> 1
 atgcagagca ataaaacttt taacttggag aagcaaaacc aactccaag gaaacatcat 60
 cagcatcacc atcagcagca ccaccagcag caacagcagc agccaccgcc tccaccaata 120
 cctgcaaacg ggcagcaagc cagcagccag aatgaaggct taactattga cctgaagaat 180
 tttaggaaac caggagagaa gaccttcacc caacgtagcc ggctctttgt gggcaatctt 240
 cctcctgaca tcaactgagga ggaaatgagg aaactatttg agaaatacgg gaaggcaggc 300
 gaagtcttca ttcacaagga taaaggcttt ggctttatcc gcttggaac acgaacccta 360
 gcggagattg ccaaagtgga actggacaac atgccactcc gtggaaagca gctgcgtgtg 420
 cgctttgcct gccatagtgc atcccttacg gtccgaaacc ttctcagta tgtgtccaac 480
 gaactgctgg aggaagcctt ttctgtgttc ggccaggtag agagggtgt agtcatcgtg 540
 gatgatcgag gaaggccctc agggaaaggc attgtcgagt tttcaggga gccagctgct 600
 cgcaaagctc tggacagatg cagtgaagc tccttctgc taaccacatt tcttaggcct 660
 gtgactgtgg agcccatgga ccagttagat gatgaagagg gacttcaga gaagttggtt 720
 ataaagaacc agcaatttca caaggagcga gagcagccac ccaggtttgc acagcctggc 780
 tcttttgagt atgagtatgc tatgctgtgg aaggcactta ttgagatgga gaagcagcag 840
 caggaccaag tggaccgaaa catcaaggaa gccctgaga agctggagat ggagatggag 900
 gctgctcgcc atgaacatca ggtcatgcta atgaggcagg atttgatgag gcgtcaagaa 960
 gaacttcgga ggatggaaga gctgcataac caagaagtgc aaaaacgaaa gcagttggag 1020
 ctcagacagg aggaggaacg caggcgccgt gaggaagaga tgcggcggca gcaagaagaa 1080
 atgatgcggc gacagcagga aggattcaag ggaaccttc ctgatgcgag agagcaggag 1140
 atacggatgg gccagatggc tatgggaggt gctatgggca taaacaacag aggcgcatg 1200
 cccccctgctc ctgtgccagc tggtagacca gctcctccag gacctgccac tatgatgcca 1260
 gatggaacct tgggattgac cccaccaaca actgaacgct ttggccaagc tgctacaatg 1320
 gaaggaattg gggcaattgg tggaaccct ccagcattca accgtgcagc tcttgagct 1380
 gaatttgctc caaacaacg tcgccgatac taa 1413

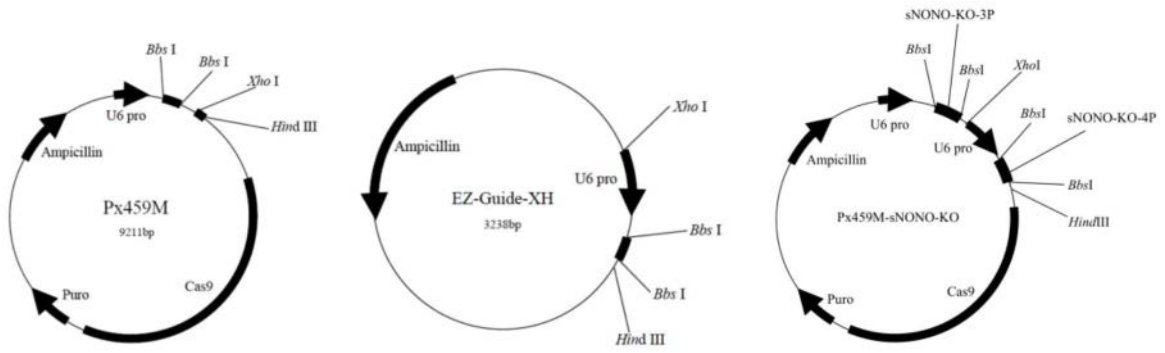


图1

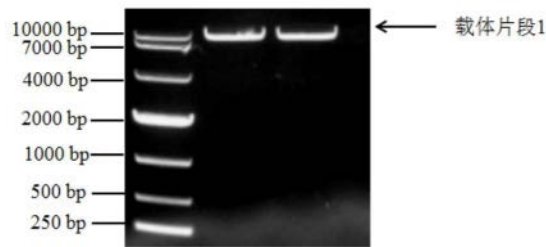


图2

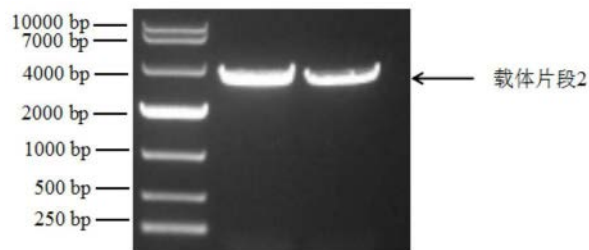


图3

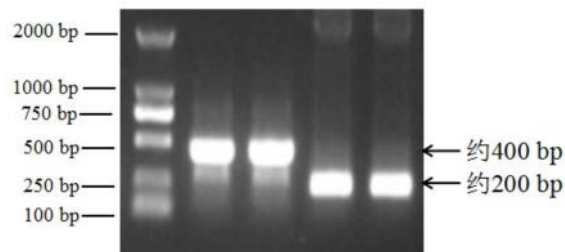


图4

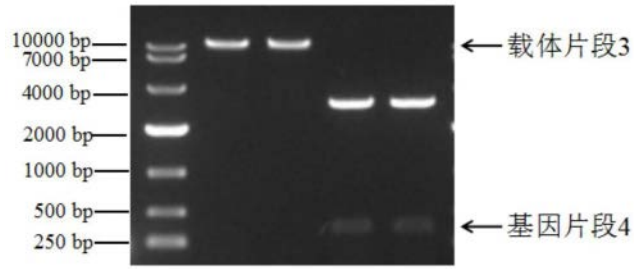


图5

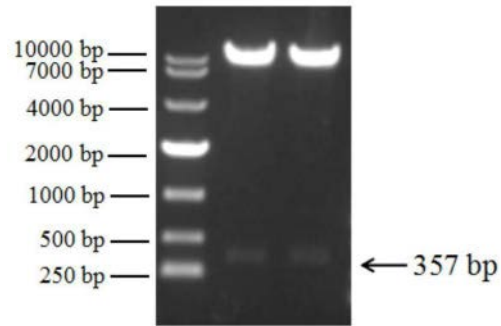


图6

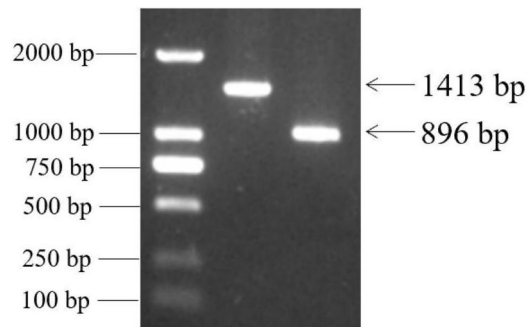


图7

```

GCGCTTTTGGCTGGCCATAGTGGCAATCCCTTACGGTCCGAAACCTTCCTCAGTATGTGTCCAAACGAACTGCTG Majority
400 430 440 450 460 470 480 490
GCGCTTTTGGCTGGCCATAGTGGCAATCCCTTACGGTCCGAAACCTTCCTCAGTATGTGTCCAAACGAACTGCTG swine NONO KO.seq
420 GCGCTTTTGGCTGGCCATAGTGGCAATCCCTTACGGTCCGAAACCTTCCTCAGTATGTGTCCAAACGAACTGCTG swine NONO.seq

GAGGAAAGCCCTTTTTCGTGTTTCGGCCAGGTAGAGAGGGGCTGTAGTTCATCGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTT Majority
429 500 510 520 530 540 550 560
GAGGAAAGCCCTTTTTCGTGTTTCGGCCAGGTAGAGAGGGGCTGTAGTTCATCGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTT swine NONO KO.seq
490 GAGGAAAGCCCTTTTTCGTGTTTCGGCCAGGTAGAGAGGGGCTGTAGTTCATCGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTT swine NONO.seq

CAGGGAAAGGCCATTTGTCGAGTTTTCAGGGAAAGCCAGCTGCTCGCAAAGCTCTGGACAGATGCAGTGAAGG Majority
429 570 580 590 600 610 620 630
CAGGGAAAGGCCATTTGTCGAGTTTTCAGGGAAAGCCAGCTGCTCGCAAAGCTCTGGACAGATGCAGTGAAGG swine NONO KO.seq
560 CAGGGAAAGGCCATTTGTCGAGTTTTCAGGGAAAGCCAGCTGCTCGCAAAGCTCTGGACAGATGCAGTGAAGG swine NONO.seq

CTCCTTTCCTGCTAACCCACATTTCCCTAGGCCCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAAGTTAGATGATGAAGA Majority
429 640 650 660 670 680 690 700
CTCCTTTCCTGCTAACCCACATTTCCCTAGGCCCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAAGTTAGATGATGAAGA swine NONO KO.seq
630 CTCCTTTCCTGCTAACCCACATTTCCCTAGGCCCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAAGTTAGATGATGAAGA swine NONO.seq

GGACTTCCAGAGAAAGTTGGTTATAAAGAAACCAGCAATTTTCAAAAGGAGCGAGAGCAGGCCACCCAGGTTT Majority
429 710 720 730 740 750 760 770
GGACTTCCAGAGAAAGTTGGTTATAAAGAAACCAGCAATTTTCAAAAGGAGCGAGAGCAGGCCACCCAGGTTT swine NONO KO.seq
700 GGACTTCCAGAGAAAGTTGGTTATAAAGAAACCAGCAATTTTCAAAAGGAGCGAGAGCAGGCCACCCAGGTTT swine NONO.seq

CACAGCCCTGGCTCTTTTGAATATGAGTATGCTATGCGCTGGAAAGGCACCTTATTGAGATGGAGAAGCAGCA Majority
429 780 790 800 810 820 830 840
CACAGCCCTGGCTCTTTTGAATATGAGTATGCTATGCGCTGGAAAGGCACCTTATTGAGATGGAGAAGCAGCA swine NONO KO.seq
770 CACAGCCCTGGCTCTTTTGAATATGAGTATGCTATGCGCTGGAAAGGCACCTTATTGAGATGGAGAAGCAGCA swine NONO.seq

GCAGGACCAAGTGGACCGAAACATCAAGGAAGCCCGTGGAGAAAGCTGGAGATGGAGATGGAGGCTGCTCGC Majority
429 850 860 870 880 890 900 910
GCAGGACCAAGTGGACCGAAACATCAAGGAAGCCCGTGGAGAAAGCTGGAGATGGAGATGGAGGCTGCTCGC swine NONO KO.seq
840 GCAGGACCAAGTGGACCGAAACATCAAGGAAGCCCGTGGAGAAAGCTGGAGATGGAGATGGAGGCTGCTCGC swine NONO.seq

CATGAACATCAGGTCATGCTAATGAGGCCAGGATTTGATGAGGCCGTCAAGAAAGAACTTTCGGAGGATGGAA Majority
429 920 930 940 950 960 970 980
CATGAACATCAGGTCATGCTAATGAGGCCAGGATTTGATGAGGCCGTCAAGAAAGAACTTTCGGAGGATGGAA swine NONO KO.seq
910 CATGAACATCAGGTCATGCTAATGAGGCCAGGATTTGATGAGGCCGTCAAGAAAGAACTTTCGGAGGATGGAA swine NONO.seq
    
```

图8

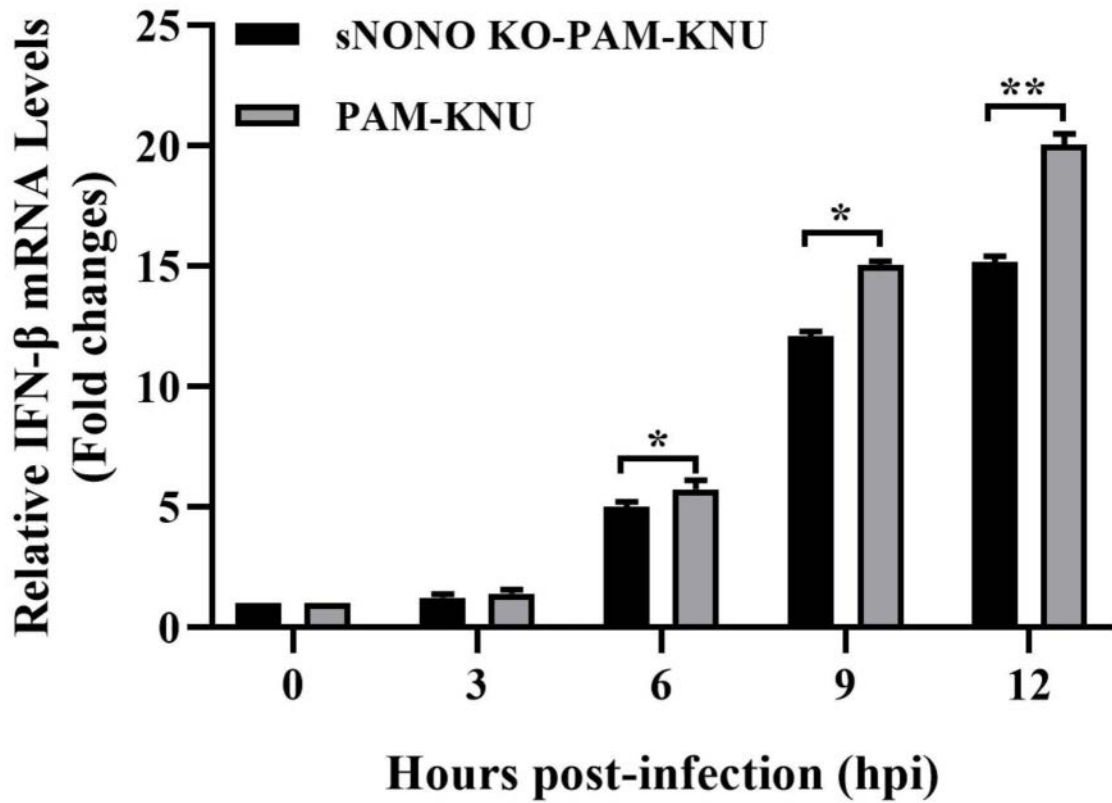


图9

PRV SD1404

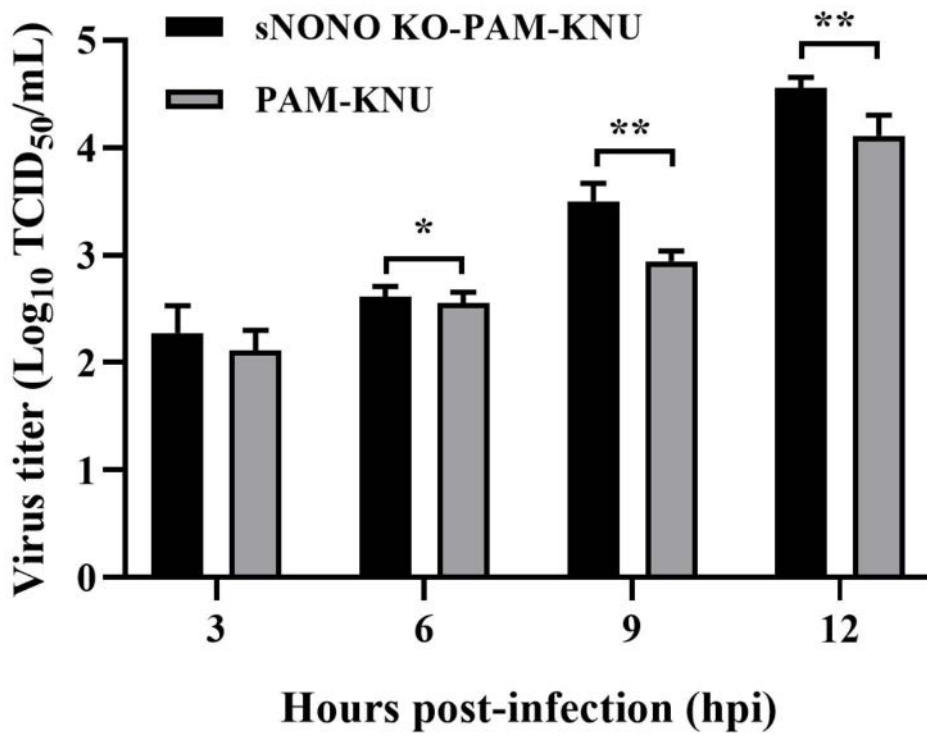


图10

PRV Bartha-K61

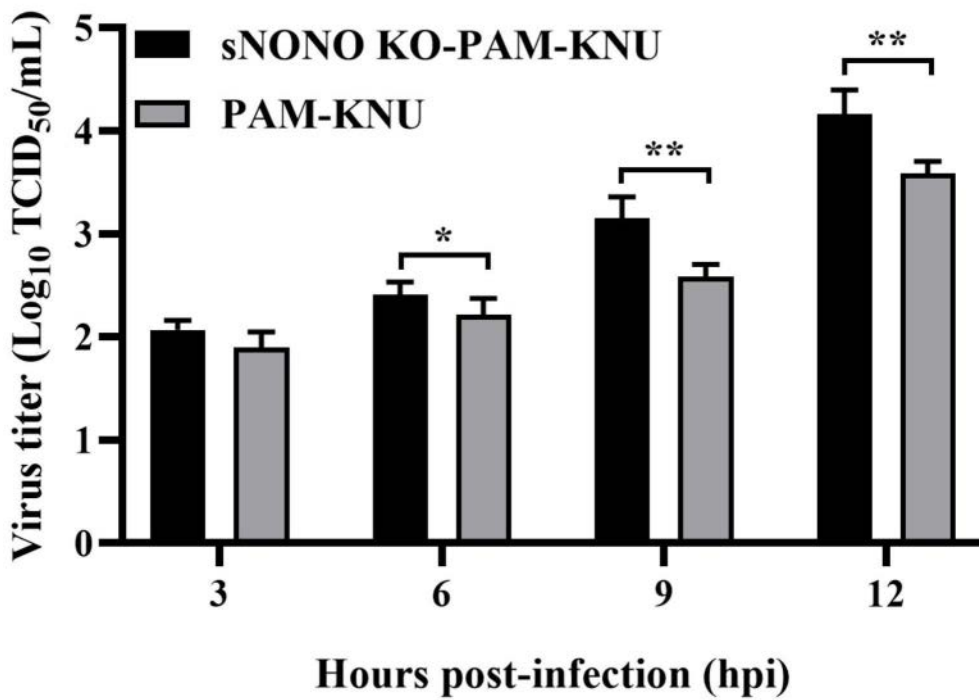


图11