

一种提高腺相关病毒产量的核酸构建体及其构建方法

技术领域

本发明涉及基因转移载体技术领域，特别是涉及一种提高腺相关病毒产量的核酸构建体及其构建方法。

背景技术

重组腺相关病毒（rAAV）是一种在基础研究和临床基因治疗中被广泛应用的基因转移载体。由于其安全性好、宿主细胞范围广、免疫原性低、在体内表达外源基因时间长等特点，rAAV 被视为最有前途的基因转移载体之一，在世界范围内的基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。近年来，越来越多的研究者使用 rAAV 进行大型动物研究和人类临床试验。AAV 基因组包含三个核心元件：ITR 序列、非结构蛋白 Rep、结构蛋白 Cap。

昆虫杆状病毒系统是生产重组蛋白的常用手段，相比于传统三质粒瞬转生产的方式，昆虫细胞具有培养密度高、可无血清悬浮培养、易于放大规模等优点，且杆状病毒感染细胞的生产方式更具有批次稳定性。尽管从 2002 年开始，研究者们开始将其用于 rAAV 的生产，但是昆虫细胞中由于各种原因，例如 Cap、Rep 和 AAV 载体基因组 DNA 的比例不容易达到理想比例，AAV 的包装效率不高，而且传统的方法包装完成的重组 AAV 载体空壳率较高（11%-34%）（Benskeyetal.2016）。而空壳 AAV 是制备临床级 AAV 载体中必须要去除的杂质，因为空壳 AAV 和携带目的基因的 AAV 理化性质非常接近，纯化难度很高。

20

发明内容

鉴于以上所述现有技术的缺点，本发明的目的在于提供一种提高重组腺相关病毒产量及其质量的核酸构建体及其构建方法，用于解决现有技术中的问题。

为实现上述目的及其他相关目的，本发明第一方面提供的核酸构建体包括：AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸和编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸，所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件。

在一些实施方式中，所述 IE 蛋白由 Acie0、Acie01、Acie02 中的一种或几种基因编码，和/或，所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4、hr5 中的一种或几种。

在一些实施方式中，所述核酸构建体还包括 IE 蛋白基因的启动子。在一些实施方式中，所述 IE 蛋白基因的启动子选自 Gp64、pH、p6.9 或 p10 中的一种或几种。

在一些实施方式中，所述核酸构建体还包括杆状病毒启动子。在一些实施方式中，所述

杆状病毒启动子与杆状病毒重组同源区连接。在一些实施方式中，所述杆状病毒启动子优选为 pH、Gp64、p6.9 或 p10 中的一种或几种。

在一些实施方式中，所述 AAV 顺式作用元件选自 ITR 序列。

在一些实施方式中，所述核酸构建体还包括外源目的基因。在一些实施方式中，所述外源目的基因嵌入 AAV 元件中。

在一些实施方式中，所述核酸构建体的结构包括：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。在一些实施方式中，所述核酸构建体的结构为：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。

在一些实施方式中，所述核酸构建体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO.1，或者包括跟 SEQ ID NO.1 比较至少具有 75%，80%，85%，90%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同源性的核苷酸序列。在一些实施方式中，所述核酸构建体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

在一些实施方式中，所述核酸构建体为腺相关病毒载体或重组杆状病毒载体。在一些实施方式中，所述核酸构建体为腺相关病毒载体。在一些实施方式中，所述核酸构建体为重组杆状病毒载体。在一些实施方式中，所述重组杆状病毒载体优选为重组杆状病毒穿梭载体。

本发明第二方面提供一种重组杆状病毒，所述重组杆状病毒为由任何一种所述的核酸构建体经杆状病毒系统构建获得，或由包括任一所述核酸构建体中任意元件的核酸构建体共同经杆状病毒系统构建获得。

本发明第三方面提供一种腺相关病毒，所述腺相关病毒为由任何一种所述的重组杆状病毒感染细胞后包装获得。

本发明第四方面提供一种细胞系，所述细胞系为经任何一种所述的重组杆状病毒感染的细胞系。

本发明第五方面提供一种腺相关病毒载体系统，所述腺相关病毒载体系统包括杆状病毒系统和所述的核酸构建体。

本发明第六方面提供所述核酸构建体的构建方法，所述构建方法包括将携带外源目的基因的 AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸和编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。

所述方法包括以下特征中的一项或几项（例如两项或三项）：

- 1) 所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件，例如所述 AAV 顺式作用元件优选为 ITR 序列；
- 2) 所述编码 IE 蛋白的多核苷酸选自 Acie0、Acie01 或 Acie02 中的一种或几种；

3) 所述杆状病毒载体骨架选自 pFastBacdual、pFastBac1、pFastBacHTA、pFastBacHTB 或 pFastBacHTC 中的一种；或

4) 所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4 或 hr5 中的一种或几种。

本发明第七方面提供一种腺相关病毒产量的生产方法，所述生产方法包括以下步骤：将

5 所述的重组杆状病毒感染昆虫细胞系。

如上所述，本发明的一种提高腺相关病毒产量的核酸构建体及其构建方法，至少具有以下有益效果：

1) 本发明明显降低了杆状病毒载体中插入目标基因在昆虫细胞中的表达，减少了目标基因表达对昆虫细胞的影响；改善生产细胞生长指标使其更有利于 rAAV 的包装生

10

2) 相比传统的贴壁 293 和 293T 细胞的生产，以及常规的杆状病毒生产方式，本优化后的载体构建方法明显提高了单个细胞以及单位体积培养物的 rAAV 产量，降低了生产成本，并且可规模放大。

3) 应用范围广，包括各种规模和类型的腺相关病毒基因治疗载体生产。

15

附图说明

图 1 显示为本发明的 pFBd-Cap-ITR-Rep 载体结构示意图。

图 2 显示为本发明的 pFBd-Cap-ITR-Rep 载体图谱示意图。

图 3 显示为本发明的 pFBd-IE-hr1Cap-ITR-Rep 载体结构示意图。

20

图 4 显示为本发明的 pFBd-IE-hr1Cap-ITR-Rep 载体图谱示意图。

图 5 显示为本发明的 BV-Cap-ITR-Rep 和 BV-IE-hr1Cap-ITR-Rep 感染 SF9 细胞后 2-4 d EGFP 表达量比较。

图 6 显示为本发明的 AAV Cap 单抗对两种 BV 感染细胞裂解液的 WB 检测。

图 7 显示为本发明的 rAAV2 电镜检测（滴度 $2.0E+13$ VG/mL）。

25

图 8 显示为本发明的 BV-Cap-ITR-Rep 和 BV-IE-hr1Cap-ITR-Rep 包装的 rAAV2 感染 293T 细胞 2 d 后荧光观察。

具体实施方式

本发明至少部分基于以下发现，即包含 AAV 元件，编码 IE 蛋白的多核苷酸，以及编码

30 杆状病毒重组同源区的多核苷酸的核酸构建体可以明显控制插入目标基因在作为杆状病毒宿主的昆虫细胞内的表达，改善细胞状态，提高腺相关病毒的包装效率，从而大幅增加腺相关

病毒的产量。本发明能够出人意料地降低 rAAV 的空壳率（比如，即使提高 Cap 的表达量也不会导致空壳的增加），产生具有更好感染性的 rAAV，以及明显提高单个细胞和单位体积培养物的 rAAV 产量，从而适合大规模的生产各种腺相关病毒基因治疗载体。

除非下文另外定义，本发明所提及的所有技术和科学用语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的意义。

术语“核酸构建体”是指可以被引入靶细胞或组织中的人工构建的核酸区段，所述核酸构建体可以为慢病毒载体或腺相关病毒载体，慢病毒载体或腺相关病毒载体包括载体骨架即空载体与表达框架。

术语“载体”是指用于将一个或多个核酸或一个或多个多核苷酸引入或转移到靶细胞或组织中的核酸片段或多核苷酸片段。典型地，载体用于将外源 DNA 引入另一个细胞或组织中。载体可以包含用于在细菌中生长的细菌抗性基因和用于在生物体中表达目的蛋白质的启动子。DNA 可以通过 PCR 或任何其他本领域技术人员已知的一种或多种合适的技术在体外产生。

本发明第一方面提供一种核酸构建体，所述核酸构建体包括：AAV 元件和编码 IE 蛋白的多核苷酸的多核苷酸，所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件。

在一种实施方式中，所述核酸构建体还包括编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸。

在一些实施方式中，所述核酸构建体的核苷酸序列包括 SEQ ID NO.1，或者包括跟 SEQ ID NO.1 比较至少具有 75%，80%，85%，90%，95%，96%，97%，98%，或 99% 同源性的核苷酸序列。在一些实施方式中，所述核酸构建体的核苷酸序列如以下 SEQ ID NO.1 所示。

SEQ ID NO: 1:

TTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTCTGTCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTG
ACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGC
GCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
CCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCC
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAATCTTGTTCCAAAC
TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAA

ATATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATT
CCCTTTTTTTCGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
5 AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCTG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
10 TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGG
AGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
15 GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGT
CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGG
ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGT
20 TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC
TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
ACCAAATACTGTCCTTCTAGTG TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
25 GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGG
GCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
GAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCG
GACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA
GGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
30 CGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATC
CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCG
GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGG

CAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGAC
AATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGA
CAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTT
GTTATGGCTAAAGCAAACCTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCCGTCGTATTAAAGAG
5 GGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAAC
AACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGG
GTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGC
GGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCT
CATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAG
10 ACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTA
AGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTC
TTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGC
TACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGT
CAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAG
15 GGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAAC
ATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTG
TACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGC
GTTCCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCAATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
20 CACCCGGAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACG
AGCGCAAGGTTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACG
GCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGTAGACCTCGGCCGTCG
CGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGA
AGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCCTACGTA
25 CCCGTAGTGGCTATGGCAGGGCTTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTC
ACCCGAACCTTGGGGGTTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGTCCCAA
TGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATG
AACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGG
TTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGGTACCGCA
30 TGCCTTAGTTGAACTCGAACTTCTTGTACTTGCAGTTGAGCTTTTGCTCGGCGAATGTGA
TGGCGTCGGAGAGTGGCACCAAGTCCCTGCAGGATCAAGGCCAAGAGCTTCAGCAAGTT
GTTGTGCAGTGTAGTTGACTCGCGACGGTTGACCTTGCCGATCACGAACATGTGGTGCT
TGAATCTGTTGTACTTTTGGATGACCTGGCTCACATCAACGTCCTTGATTTCCGCCAGAGA
TCCAGTAGAACTCCTTGTCTTCTTAGCGATGGTCAGCCTTTCCTCGTTCTTGAAGGACA

ACACGATGAAGTTGTGACCCTTAACGTTATCGACGTTTTGAGTCAAGTACTGCTCAACGA
TGTGCATGCTTCCGTCTTCCTTCTTGACCTTCTTGAGGTTCTCGGCGTTGTTGTTAGAAG
CGATGTTGTCTGGTACTTGTAGTTGTTGAAGAGCAGGTTAGCGACGGACGAGTACTTG
TATGTCAGAGTGCTCTTCTTGTTTACGATGAGGTTTACAGGTTATCAACGACGTACTTGTTG
5 GGAGGGTTGTCCGGGAATTGGACGGACTCCGAGTACTTGAGGATCTGGGAAACGTATG
GCGAGACGAAGAAGTTGTTAGAGGCGGTTTCGATCTCGTTTGATTCCCTGCGGCTCAGC
ATGATGGGCAAAGTGAAGAGGTTCTTGTCTGGTACATCTCGTACAACCTTCGACAAGAG
GAATCCACACTTACGCTCGCCGAGTGATTGCAGCAAGGTCACGAAGGTTGTCTGAGCGT
AGTACATATCGAGGTTGAAGTAGGAGGTCAGAGCGGCCTTGAATGTGTGGTGGACGTCC
10 ACGAAGTGACACTTCTTGCAGTTTTGAGCGGCGGTCTCATCGTTGCAGACGTCCTGTGA
GTGTGGGATTTTCGATGCCAGTCTCCTTAACCAGGTTGTAGCTGATCATGAAGCGGATCTT
ATCGAAGGTCACAACGAACACACGGTTGTCAACCATGTAGTAGTTGTTTGTGTACTCGT
AGACCACGTTAGAGACGTACTTGGCGAAGATGATTCGAAAGGCTTCACCTCGGACTTC
TTAACGACGAACATGTAGTAACCGGTTTCAGACATGTGATCGGAGAATCTGTTTCGAGTT
15 GTAGTCGTTATCGTCGAACCTCATCAGGTAGGGGGCGAAGTCGTTTGTGAAGTAGTGAG
TGATCTCCTGGGTGGAAGCCACTGTACAGATGTTAGTGTTGTGGTTGATGGTTTGTTCGA
GTGTAGCGCATGACTGGATGGTGTCTTCTTGTACTTAGGTCTCAACTTGATCTTGTTGA
ATTGACCCACAACCTCCCTGGGAGTTATCCAGGTAAGTCTCGTCCAACTTCCTCTTGGTGCCTG
TGGCCGACGGCTGGTTGACACCAGCAGAGTGTTTGAAGGACTCGGCGTGGTAAGCTGA
20 GCTAGGAGAGGGTTGTTTCGACCACTGGCTGTTTCGAGTGACTCGCTGTAGTAGGCAGAG
GACACAGCTTCCTCCAGGTTGTCAGTGGTCTTGAGCAGACACTCCACCAAATCGTTGTC
AGTGAGCGAGTTAACTGAGGCGAGGAAGTTGCTAGCGGCAGCGGTTTCAGAGTCGGAG
ATGACAGTATCAGCTCCGTCCGGGGTGGGTGGTTGTAGTAAGACAAGTAATCGTTAGG
TTGCTTGTCTCGAAGTCCGAGTATGAGTTGTCTGAAGCTAGCACGAGAGGGAGTGCTG
25 GCAGAGGTGTAGGAAGCGTTGAAGTTGATTTGAGTCATGGTGACCTGGTTGTTACGAT
CTTATCGCCACCTGTGTCCACCTGCAGTTGCTGGGCCTCAGCGCAGGCTGAAGTGGCCT
CACAGGAGTAGGGGCTGGAAGCACAGTTGGAAGTCATGATGTTTTCTTGGACGTTTCAGG
ACGTGGCTGGATGTACGGATCATGCGCCCGATGGTGGGACGGTATGAATAATCCGGAATA
TTTATAGGTTTTTTTTATTACAAAACCTGTTACGAAAACAGTAAAATACTTATTTATTTGCGA
30 GATGGTTATCATTTTAATTATCTCCATGATCGGATCTCCTAGGCTCAAGCAGTGATCAGAT
CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGCAGTGAAA
AAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAACCATTATAAGCTGCA
ATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTTGTCTAGTACTTCTCGACGGTACCGCATGCT
ATGCATCAGCTGCTAGCACCATGGCTCGAGTTACAGATTACGAGTCAGGTATCTGGTGCC

AATGGGGCGAGGCTCTGAATACACGCCATTAGTGTCCACAGTAAAGTCCACATTAACAG
ACTTGTGTAGTTGGAAGTGTACTGAATTCGGGATTCCAGCGTTTGCTGTTTCCTTCT
GCAGCTCCCACTCGATCTCCACGCTGACCTGTCCCGTGGAGTACTGTGTGATGAAGGAA
GCAAACCTTTGCCGCACTGAAGGTGGTCGAAGGATTTCGCAGGTACCGGGGTGTTCTTGAT
5 GAGAATCTGTGGAGGAGGGTGTTTAAGTCCGAATCCACCCATGAGGGGAGAGGGGTGA
AAATGTCCGTCCGTGTGTGGAATCTTTGCCAGATGGGCCCCTGAAGGTACACATCTCTG
TCCTGCCAGACCATGCCTGGAAGAACGCCTTGTGTGTTGACATCTGCGGTAGCTGCTTG
TCTGTTGCCTCTCTGGAGGTTGGTAGATACAGAACCATACTGCTCCGTAGCCACGGGATT
GGTTGTCCTGATTTCTCTTCGTCTGTAATCATGACCTTTTCAATGTCCACATTTGTTTTCT
10 CTGAGCCTTGCTTCCCAAAGATGAGAACCCCGCTCTGAGGAAAAAACTTTTCTTCATCG
TCCTTGTGGCTTGCCATCGCCGGGGCCCGGATTCACCAGAGAGTCTCTGCCATTGAGGTG
GTACTTGGTAGCTCCAGTCCACGAGTATTCCTGTTGTTGTTATCCGCAGATGTCTTTGAT
ACTCGCTGCTGGCGGTAAACAGGGTCCAGGAAGCCAGTTCCTAGACTGGTCCCGAATGTC
ACTCGCTCCGGCCTGAGAAAACCTGAAGCCTTGACTGCGTGGTGGTTCCACTTGGAGTGT
15 TTGTTCTGCTCAAGTAATACAGGTACTGGTCGATGAGAGGATTCATGAGACGGTCCAGA
CTCTGGCTGTGAGCGTAGCTGCTGTGGAAAGGAACGTCCTCAAAAGTGTAGCTGAAGG
TAAAGTTGTTTCCGGTACGCAGCATCTGAGAAGGAAAGTACTCCAGGCAGTAAATGAA
GAGCGTCCTACTGCCTGACTCCCGTTGTTTCAGGGTGAGGTATCCATACTGTGGCACCATG
AAGACGTCTGCTGGGAACGGCGGGAGGCATCCTTGATGCGCCGAGCCGAGGACGTACG
20 GGAGCTGGTACTCCGAGTCAGTAAACACCTGAACCGTGCTGGTAAGGTTATTGGCAATC
GTCGTCGTACCGTCATTCTGCGTGACCTCTTTGACTTGAATGTTAAAGAGCTTGAAGTTG
AGTCTCTTGGGTCGGAATCCCCAGTTGTTGTTGATGAGTCTTTGCCAGTCACGTGGTGA
AAAGTGGCAGTGGAATCTGTTGAAGTCAAAATACCCCCAAGGGGTGCTGTAGCCAAAG
TAGTGATTGTCGTTTCGAGGCTCCTGATTGGCTGGAAATTTGTTTGTAGAGGTGGTTGTTG
25 TAGGTGGGCAGGGCCCAGGTTCCGGGTGCTGGTGGTGATGACTCTGTCGCCCATCCATGT
GGAATCGCAATGCCAATTTCCCGAGGAATTACCCACTCCGTCGGCGCCCTCGTTATTGTC
TGCCATTGGTGCGCCACTGCCTGTAGCCATCGTATTAGTTCCCAGACCAGAGGGGGCTG
CTGGTGGCTGTCCGAGAGGCTGGGGGTGAGGTACTGAGTCTGCGTCTCCAGTCTGACCA
AAATTCAATCTTTTTCTTGCAGGCTGCTGGCCCCGCCTTTCCGGTTCCCGAGGAGGAGTCT
30 GGCTCCACAGGAGAGTGCTCTACCGGCCTCTTTTTTCCCGGAGCCGTCTTAACAGGTTC
CTCAACCAGGCCAGAGGTTCAAGAACCCTCTTTTTTCGCCTGGAAGACTGCTCGTCCGA
GGTTGCCCCCAAAGACGTATCTTCTTAAAGGCGCTCCTGGAACCTCCGCGTCGGCGTGG
TTGTACTTGAGGTAAGGGTTGTCTCCGCTGTGAGCTGCCGGTCGTAGGCTTTGTCGTGC
TCGAGGGCAGCGGCGTCTGCCTCGTTACCGGCTCTCCCTTGTCCAGTCCGTTGAAGGG

TCCGAGGTA CTTGTACCCGGGAAGCACAAGGCCCTGCTGTCGTCCTTATGCCGCTCTG
CGGGCTTTGGTGGTGGTGGGCCGGGTTTGAGCTTCCACCACTGTCTTATTCCTTCAGAG
AGAGTGTCTCGAGCCAATCGGGTAGATAACCGTCGGCAGCCGTGGCGGCTCAAGTCTT
CGTCGAGTGATTGTAAATAAAATGTAATTTACAGTATAGTATTTTAATTAATATACAAATGA
5 TTTGATAATAATTCTTATTTAACTATAATATATTGTGTTGGGTTGAATTAAGGTCCGTATCT
CCAGACTGCAGTTTAAATTGTGTAATTTATGTAGCTGTAATTTTACCTTATTAATATTTTTT
ACGCTTTGCATTCGACGACTGAACTCCCAAATATATGTTTAACTCGTCTTGGTCGTTTGAA
TTTTTGTGCTGTGTTTCCTAATATTTTCCATCACCTTAAATATGTTATTGTAATCCTCAATG
TTGAACTTGCAATTGGACACGGCATAGTTTTCCATAGTCGTGTAAAACATGGTATTGGCT
10 GCATTGTAATACATCCGACTGAGCGGGTACGGATCTATGTGTTTGAGCAGCCTGTTCAAA
AACTCTGCATCGTCGCAAAACGGAATTTGGTCACGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAAT
TCAAAGCGCTACGTCAGCGACGTCATCGATTATTGCTCCAATACTAGGGTTTTGTTTTACT
ATCTGTTCTGCGGTCCACACATCTTCTTCGCTAGTCACGTACGCAAACAACCTCGGGCCGC
AAAGGTGTTTTTAAACATATCAGATTAGAATCTTTTATAACTTGGCCGCATTGTAAATAGT
15 TGTGCCAACGCGCGGGAAACATTTTACACGTGCTTTCAATCTTATCTCATAAACGCAACT
AAATATGATCCTTCAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATTAATTAT
GACTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACCGAACTCGCTTTACGAGTA
GAATTCTACGCGTAAACACAATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACA
CGGCTCATAACCGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATCAGTGGA
20 TGATGTCATAAACTTATCTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACTTGAGTCATAAGCTGATA
TCAGAAGATTATTAACGTGTTTAGGTATGACTCATTTGTTTTCAAACTGAACTCGCTTTA
CGGATAGAATTCTACTTGTAACACAATCAGGGGATGATGTCATTATACAAATGATGTCA
TTTGTTTTTCAAACTAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCTACTTGTAACACAATCGA
GGGATAATGTCATTTGTTATTCTCAAATATGATGTCATTTAAATTTTTATTATGCAAGAATT
25 GTATGTTGCTGTGTCATTTATGAATGTTTTATCGACAACCTGTTTATTTGTTTCATTGACTT
GTTGTTGTTTCGTGATTATGATTAATTATAAATCTTTTGTGGGGTCAACATCGATGTATACG
CCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCT
CACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCA
30 GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCTACG
CGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA
TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT
CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG

CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCATTATGCCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGG
GATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
5 GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCG
CTACCGGTCGCCACCGTCGACGTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTA
ACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCT
GCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGA
10 TGTGGGAGGTTTTTTAAAGTTTAAACAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGG
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGACATGTGAGCAAAAGGCC
AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCGCGGCCGCTCTAGAGATCATGGAGAT
15 AATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG
TAATAAAAAAACCTATAAATATTCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATC
CGCCGCCCTGGCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGC
ATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAGTGGGAGTTG
CCGCCAGATTCTGACTTGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGA
20 GAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAGTGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCCGGAGGCC
CTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACTTACACGTGCTCGTGGA
AACCACCGGGGTGAAATCCTTAGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTTCGCGAAAAAC
TGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTCACA
AAGACCAGAAACGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGACGAGTGCTACATCCCC
25 AATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATTTAGAACA
GTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGA
CGCACGTGTCGCAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGACGC
GCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGG
ACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATACAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCC
30 TTCAATGCGGCCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAA
GATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGG
ACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGC
GGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGG
CTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGT

GCCCTTCTACGGGTGCGTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGG
ACAAGATGGTGTCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGC
CAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCC
CAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGA
5 CGGGAAGTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTT
GAACTACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAG
ACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAA
AAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCCAAC
GGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCATCGATCAACTA
10 CGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTC
CCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAG
AAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCTGCAAAAA
GGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCAC
TGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAATCTAGAGC
15 CTGCAGTCTCGACAAGCTTGTCTGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATT
TGTAGAGGTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAA
AATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGC
AATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT
CCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGCTTGAGCCTAGGAGATC
20 CGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAACTATTTTGTCAATTTTAAATTTTCGTATTAGC
TTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAA
CTCCATTTCCACCCCTCCAGTTCCCACTATTTTGTCCGCCACAGCGGGGCATTTTTCT
TCCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGC
TACTTT

25 在一些实施方式中，所述 AAV 元件来源于不同血清型的 AAV，例如 AAV1、AAV2、
AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV DJ、AAV DJ/8、AAV
rh10、AAV Retro、AAV PHP.eB、AAV PHP.B 或 AAV PHP.S。不同血清型 AAV 的衣壳蛋白
识别细胞表面的受体不同，因而对不同组织细胞的侵染效率差异可能很大，表现出一定的器
官靶向特异性。可以根据具体的实验目的选择合适血清型的 AAV，从而实现特定血清型
30 AAV 对特定类型细胞组织特异性的高效转导。

在一些实施方式中，所述 AAV 元件来源于 AAV1。在一些实施方式中，所述 AAV 元件
来源于 AAV2。在一些实施方式中，所述 AAV 元件来源于 AAV3。在一些实施方式中，所述
AAV 元件来源于 AAV4。在一些实施方式中，所述 AAV 元件来源于 AAV5。在一些实施方

式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV6。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV7。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV8。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV9。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV DJ。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV DJ/8。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV rh10。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV Retro。在一些实施方式中, 所述 AAV 元件来源于 AAV PHP.eB/PHP.B/PHP.S。

所述 Cap 蛋白为结构蛋白, 通常包括 VP1、VP2 和 VP3 结构蛋白。据信在一些实施方式中, 三种结构蛋白可组装成 AAV 的衣壳蛋白。

所述 Rep 蛋白为非结构蛋白, 通常包括 Rep78 和 52 蛋白。据信在一些实施方式中, Rep 蛋白可调控 DNA 的复制和包装。

在一种实施方式中, 所述 AAV 顺式作用元件选自反向末端重复序列 (ITR 序列)。据信在一些实施例中, 所述 ITR 序列可折叠成发夹结构, 是 AAV DNA 复制起始和包装重组 AAV 病毒颗粒所需的唯一已知顺式作用元件。

在一些实施方式中, 所述核酸构建体还包括外源目的基因。在一些实施方式中, 所述外源目的基因由 AAV 元件携带, 即外源目的基因嵌入 AAV 元件中。

具体的, 在一些实施方式中, 所述外源目的基因嵌入两端 ITR 序列之间。

较佳的, 在一些实施方式中, 所述外源目的基因的大小 ≤ 3.5 kb。据信在一些实施方式中, 由于受到两端 ITR 序列之间的大小限制, 因此外源目的基因的大小一般不可过大, 否则可能会导致包装效果较差。

所述外源基因的种类根据实验目的不同而不同。所述外源基因可以为各种疾病治疗的相关基因, 例如 AADC、FVIII、FIX, 还可以为实验室常用的工具基因如 EGFP、mCherry 基因等等。

据信在一些实施方式中, 所述核酸构建体还包括 IE 蛋白基因的启动子。据信在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子选自 Gp64、pH、p6.9 或 p10 中的一种或几种。在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子包括 Gp64。在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子包括 pH。在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子包括 p6.9。在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子包括 p10。

较佳的, 在一些实施方式中, 所述 IE 蛋白基因的启动子选自 pH 强启动子。据信在一些实施方式中, 在核酸构建体中加入 ie 的额外拷贝并在强启动子 pH 的控制下表达, 使其高于病毒内源性水平, 增加了杆状病毒感染后晚期细胞的存活。

在一些实施方式中，所述 IE 蛋白选自由 Acie0、Acie01 或 Acie02 中的一种或几种（例如两种或三种）基因编码的蛋白。在一些实施方式中，所述 IE 蛋白选自 Acie0 编码的蛋白，即 IE0。所述 Acie0 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示，所述 IE0 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示。在一些实施方式中，所述 IE 蛋白选自 Acie01 编码的蛋白，即 IE1。所述 Acie01 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示，所述 IE1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示。在
5 一些实施方式中，所述 IE 蛋白选自 Acie02 编码的蛋白，即 IE2 蛋白。所述 Acie02 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示，所述 IE2 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.15 所示。

SEQ ID NO.10-15 的序列如下所示：

SEQ ID NO.10:

10 ATGATAAGAACCAGCAGTCACGTGCTGAACGTCCAGGAAAATATAATGACGTCAAA
CTGTGCGTCATCGCCATATTCGTGCGAGGCAACGTCCGCTTGCGCAGAAGCTCAGCAGG
TAATGATCGATAACTTTGTTTTCTTTACATGTACAACGCCGACATACAAATTGACGCAA
AGCTGCAATGCGGCGTGCGCTCGGCCGCGTTTGCAATGATCGACGATAAACATTTGGAA
ATGTACAAGCATAGAAATAGAGAATAAATTTTTTTATTACTATGATCAATGTGCCGACATTG
15 CCAAACCCGACCGTCTGCCCCGATGACGACGGCGCGTGCTGTCACCATTTTATTTTTGATG
CCCAACGTATTATTCAATGTATTAAAGAGATTGAAAGCGCGTACGGCGTGCGTGATCGCG
GCAATGTAATAGTGTTTTATCCGTACTTGAAACAGTTGCGAGACGCGTTGAAGCTAATTA
AAAACCTCTTTGCGTGTTGTTTTAAATTATAAATTCTATGCAAATGTACGTGAACGAGTT
AATATCAAATTGCCTGTTGTTTATTGAAAAGCTGGAACTATTAATAAACTGTAAAGTT
20 ATGAATTTGTTTGTAGACAATTTGGTTTTGTACGAATGCAATGTTTGTAAGAAATATCTA
CGGATGAAAGATTTTTAAAGCCAAAAGAATGTTGCGAATACGCTATATGCAACGCGTGCT
GCGTTAACATGTGGAAGACGGCCACCACGCACGCAAAATGTCCAGCGTGACAGGACATC
GTATAAATAA

25 SEQ ID NO.11:

MIRTSSHVLNVQENIMTSNCASSPYSCEATSACAEAAQQVMIDNFVFFHMYNADIQIDAK
LQCGVRSAAFAMIDDKHLEMYKHRIENKFFYYDQCADIAPDRLPDDDGCCHHFIFDA
QRIIQCIKEIESAYGVRDRGNVIVFYPYLKQLRDALKLIKNSFACCFKIINSMQMYVNELISN
CLLFIEKLETINKTVKVMNLFVDNLVLYECNVCKEISTDERFLKPKECCEYAICNACCVNM
30 WKTATTHAKCPACRTSYK

SEQ ID NO.12:

ATGATCCGTACATCCAGCCACGTCCTGAACGTCCAAGAAAACATCATGACTTCCAAC

TGTGCTTCCAGCCCCTACTCCTGTGAGGCCACTTCAGCCTGCGCTGAGGCCAGCAACT
GCAGGTGGACACAGGTGGCGATAAGATCGTGAACAACCAGGTCACCATGACTCAAATC
AACTTCAACGCTTCCTACACCTCTGCCAGCACTCCCTCTCGTGCTAGCTTCGACAACTCA
TACTCGGAGTTCTGCGACAAGCAACCTAACGATTACTTGTCTTACTACAACCACCCAAC
5 CCCGGACGGAGCTGATACTGTCATCTCCGACTCTGAAACCGCTGCCGCTAGCAACTTCC
TCGCCTCAGTTAACTCGCTCACTGACAACGATTTGGTGGAGTGTCTGCTCAAGACCACT
GACAACCTGGAGGAAGCTGTGTCCTCTGCCTACTACAGCGAGTCACTCGAACAGCCAG
TGGTGAACAACCCCTCTCCTAGCTCAGCTTACCACGCCGAGTCCTTCGAACACTCTGCT
GGTGTCAACCAGCCGTCGGCCACAGGCACCAAGAGGAAGTTGGACGAGTACCTGGATA
10 ACTCCCAGGGAGTTGTGGGTCAATTCAACAAGATCAAGTTGAGACCTAAGTACAAGAA
GAGCACCATCCAGTCATGCGCTACACTGGAACAAACCATCAACCACAACACTAACATCT
GTACAGTGGCTTCCACCCAGGAGATCACTCACTACTTCACAAACGACTTCGCCCCCTAC
CTGATGAGGTTTCGACGATAACGACTACAACCTCGAACAGATTCTCCGATCACATGTCTGA
AACCGGTTACTACATGTTTCGTTCGTTAAGAAGTCCGAGGTGAAGCCTTTCGAAATCATCTT
15 CGCCAAGTACGTCTCTAACGTGGTCTACGAGTACACAAACAACACTACTACATGGTTGACA
ACCGTGTGTTTCGTTGTGACCTTCGATAAGATCCGCTTCATGATCAGCTACAACCTGGTTA
AGGAGACTGGCATCGAAATCCCACACTCACAGGACGTCTGCAACGATGAGACCGCCGC
TCAAAACTGCAAGAAGTGTCACTTCGTGGACGTCCACCACACATTCAAGGCCGCTCTG
ACCTCCTACTTCAACCTCGATATGTACTACGCTCAGACAACCTTCGTGACCTTGCTGCAA
20 TCACTCGGCGAGCGTAAGTGTGGATTCTCTTGTGCAAGTTGTACGAGATGTACCAGGA
CAAGAACCTCTTCACTTTGCCATCATGCTGAGCCGCAAGGAATCAAACGAGATCGAAA
CCGCCTCTAACAACCTTCTTCGTCTCGCCATACGTTTCCCAGATCCTCAAGTACTCGGAGT
CCGTCCAATTCCCGGACAACCCTCCCAACAAGTACGTCGTTGATAACCTGAACCTCATC
GTGAACAAGAAGAGCACTCTGACATACAAGTACTCGTCCGTCGCTAACCTGCTCTTCAA
25 CAACTACAAGTACCACGACAACATCGCTTCTAACAACAACGCCGAGAACCTCAAGAAG
GTCAAGAAGGAAGACGGAAGCATGCACATCGTTGAGCAGTACTTGACTCAAAACGTCG
ATAACGTTAAGGGTCACAACCTTCATCGTGTGTCTTCAAGAACGAGGAAAGGCTGACC
ATCGCTAAGAAGAACAAGGAGTTCTACTGGATCTCTGGCGAAATCAAGGACGTTGATGT
GAGCCAGGTCATCCAAAAGTACAACAGATTCAAGCACCACATGTTTCGTGATCGGCAAGG
30 TCAACCGTCGCGAGTCAACTACACTGCACAACAACCTTGCTGAAGCTCTTGGCCTTGATC
CTGCAGGGACTGGTGCCACTCTCCGACGCCATCACATTCGCCGAGCAAAAGCTCAACTG
CAAGTACAAGAAGTTCGAGTTCAACTAA

SEQ ID NO.13:

MIRTSSHVLNVQENIMTSNCASSPYSCEATSACAEAAQLQVDTGGDKIVNNQVTMTQI
NFNASYTSASTPSRASFDNSYSEFCDKQPNDYLSYYNHPTPDGADTVISDSETAAASNFLAS
VNSLTDNDLVECLLKTTDNLEEAVSSAYYSESLEQPVVEQPSPSSAYHAESFEHSAGVNPQS
ATGTRKRLDEYLDNSQGVVGQFNKIKLRPKYKKSTIQSCATLEQTINHNTNICTVASTQEIT
5 HYFTNDFAPYLMRFDDNDYNSNRFSDHMSETGYMFVVKKSEVKPFIEIFAKYVSNVVYE
YTNNYYMVDNRVFTFDKIRFMISYNLVKETGIEIPHSQDVCNDETAQNCCKCHFVDV
HHTFKAALTSYFNLDMYAQTTFVTLLQSLGERKCGFLLSKLYEMYQDKNLFTLPIMLSRK
ESNEIETASNNFFVSPYVSQILKYSESQFPDNPKNKYVVDNLNLIVNKKSTLTYYKYSSVANL
LFNNYKYHDNIASNNNAENLKKVKKEDGSMHIVEQYLTQNVDNVKGHNFIIVLSFKNEERL
10 TIAKKNEFYWISGEIKDVDVVSQVIQKYNRFKHHMFVIGKVNRRRESTTLHNNLLKLLALIL
QGLVPLSDAITFAEQKLNCKYKKFEFN

SEQ ID NO.14:

ATGAGTCGCCAAATCAACGCCGCGCACTCCCAGCAGCAGCCGCCGCCACAGGCTGTC
15 TCTCAGCCGTCGCCGCATCAACTTTACAACATCTCCCGAAGCCCAGCCGTCTTCAAGCA
GTCGCAGCCAGCCGTCTTCAAGCAGTCGCAGCCATCGCCGTCAGGAGCGGCGTCAGGA
GCAGCGTGTCAGCGAAGAAAACGTGCAGATTATCGGGAACGTCAACGAGCCGTTGACG
CGCACCTACCATCGTCAGGGTGTCAGTGATTACGTGCACGGTCAGGTTAACATTAGCAAT
GACGATCCGCTATTAAGTCAAGAGGATGACGTCATACTAATTAATAGTGAAAATGTGGAT
20 CGTGAACGGTTTCCCGACATCACTGCCCAGCAGTACCAGGATAACATTGCGTCGGAGAC
AGCTGCGCAGAGGGCTCTGCAACGAGGTTTAGATCTTGAGGCTCAGCTGATGAATGAGA
TTGCCCCAAGGTCTCCCACTTATAGTCCATCTTATTCGCCGAATTACGTAATACCACAGTC
GCCAGATTTGTTTGCCCTCGCCGAGTCTCCGCAGCCGCAGCAGCAGCAGCAGCAAT
CAGAACCCGAAGAAGAAGTAGAGGTTTCGTGTAATATTTGTTTTACTACTTTTAAAGACA
25 CTAAAAACGTAAATTCCTCGTTTGTGACTTCGATTCATTGTAACCATGCTGTGTGTTTCAA
GTGTTATGTCAAGATAATTATGGACAATTCTGTGTACAAATGTTTTTGCAGCGCTACTTCA
TCAGATTGTGCGGTGTACAATAAGCACGGGTATGTAGAATTTATGCCCATTAACGTCACT
CGTAACCAGGATTCCATCAAACAGCATTGGCGCGAGCTTTTAGAAAATAACACGGTCAA
CAATCACACCACGGACTTGAACATATGTGGAGCAATTGCAAAAAGAACTGTCCGAGCTGC
30 GAGCCAAGACCAGCCAAGTTGAACATAAAATGACCATGTTAAACAGCGACTACATTATG
CTTAAACACAAGCATGCTGTGCGCGAATTAGATTTACAAAAGGCAAACCTATGACTTGCA
AGAATCTACCAAGAAATCAGAAGAGTTGCAATCGACTGTGAATAATCTGCAAGAACAAT
TGCGTAAGCAGGTGGCCGAGTCTCAAGCCAAATTTTCAGAGTTTGAGCGCAGTAACTCT
GATTTAGTTTCTAAGTTACAACTGTTATGTCTAGACGTAA

SEQ ID NO.15:

MSRQINAATPSSSRHRLSLRRRINFTTSP EAQPSSSSRSQPSSSSRSHRRQERRQEQRV
SEENVQIIGNVNEPLTRTYHRQGVTTYVHGVNINSDDP LLSQEDDVILINSENVDRERFPDI
5 TAQQYQDNIASETAAQRALQRGLDLEAQLMNEIAPRSPTYSPSYSPNYVIPQSPDLFASPQSP
QPQQQQQQQSEPEEEVEVSCNICFTTFKDTKNVNSSFVTSIHCNHAVCFKCYVKIIMDNSVY
KCFCSATSSDCRVYNKHGYVEFMPINVTRNQDSIKQHWRELLENNTVNNHTTDLNYVEQL
QKELSELRAKTSQVEHKMTMLNSDYIMLKHKHAVAELDLQKANYDLQESTKKSEELQSTV
NNLQEQLRKQVAESQAKFSEFERSNSDLVSKLQTVMSRR

10 据信在一些实施方式中, 所述 IE1 蛋白为杆状病毒立即早期基因 1 (ie1) 的产物, 所述 IE 蛋白亦可称为杆状病毒转录调控因子蛋白。它是一种多功能蛋白, 具有激活早期和晚期病毒基因和参与病毒基因组复制的能力, 参与病毒周期的调控。

在一些实施方式中, 所述杆状病毒重组同源区(hr)选自 hr1(核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示)、hr2(核苷酸序列如 SEQ ID NO.17 所示)、hr3(核苷酸序列如 SEQ ID NO.18 所示)、
15 hr4(hr4 left 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.19 所示, hr4 right 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.20 所示)、hr5(核苷酸序列如 SEQ ID NO.21 所示)中的一种或几种(例如两种, 三种, 四种或五种)。

SEQ ID NO.16-21 的序列如下所示:

SEQ ID NO.16:

20 ATCGATGTTGACCCCAACAAAAGATTTATAATTAATCATAATCACGAACAACAACAA
GTCAATGAAACAAATAAACAAGTTGTGCGATAAAACATTCATAAATGACACAGCAACATA
CAATTCTTGCATAATAAAAATTTAAATGACATCATATTTGAGAATAACAAATGACATTATC
CCTCGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTACCCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTGAAAAACA
AATGACATCATTTGTATAATGACATCATCCCCTGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTATCC
25 GTAAAGCGAGTTCAGTTTTGAAAACAAATGAGTCATACCTAAACACGTTAATAATCTTCT
GATATCAGCTTATGACTCAAGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGAGATAAGTTTATGACA
TCATCCACTGATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCCAGTTCGGTTATGAG
CCGTGTGCAAAACATGACATCAGCTTATGACTCATACTTGATTGTGTTTTACGCGTAGAA
TTCTACTCGTAAAGCGAGTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGACATCAGCTTATGA
30 GTCATAATTAATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTGAAGGATCAT
ATTTAGTTGCGTTTATGAGATAAGATTGAAAGCACGTGTAAATGTTTCCCGCGCGTTGG
CACAAC TATTTACAATGCGGCCAAGTTATAAAAGATTCTAATCTGATATGTTTTAAAACAC
CTTTGCGGCCCGAGTTGTTTGC GTACGTGACTAGCGAAGAAGATGTGTGGACCGCAGAA

CAGATAGTAAAACAAAACCCTAGTATTGGAGCAATAATCGAT

SEQ ID NO.17:

TGAGCAAAACACAACCGGCAAATTCTCGGCGGCCGTTTGGGAATGCGGAATAATTG
5 CCATATGTAAATGATGTCATCGGTTCTAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACGTGTAAAA
CATAATCAAGAGATGATGTCATTTGTTTTTCAAACTGAACTCAAGAAATGATGTCATTT
GTTTTTCAAACTGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACACAATCGAGA
GATGATGTCATATTTTGCACACGGCTCTAATTAACTCGCTTTACGAGTAAATTCTACTT
GTAACGCATGATCAAGGGATGATGTCATTGGATGAGTCATTTGTTTTTCAAACTAACT
10 CGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACACAATCAAGGGATGATGTCATTATACAAA
TGATGTCATTTGTTTTTCAAACTAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCTACTTGTAACAC
AGCAACTCGAGGGATGATGTCATCCTTTACTCGATGATTATAAACGTGTTTATGTATGACT
CATTTGTTTTTCAAACTAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATC
AAGGGATGATGTCATTTATTTGTGCAAAGCTCGATGTCATCTTTTGCACACGATTATAAAC
15 ACAATCCAAATAATGACTCATTTGTTTTCAAACTGAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCT
ACTTGTAACACAATCAAGGGATGATGTCATTTTCAAATGATGTCATTTGTTTTTCAA
AACTAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACACAATCAAGGGATGATGTCA
TTTTAAAAATGATCATTTGTTTTTCAAACTAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACGTG
TAAACACAATCAAGGGATGATGTCATTTACTAAATAAAATAATTATTTAAATAAACTGT
20 TTTTATTGTCAAATACACATTGATTCAC

SEQ ID NO.18:

ACGCGTAGAATTCTACTTGTAAGCAAGTTAAAATAAGCCGTGTGCAAAAATGACAT
CAGACAAATGACATCATCTACCTATCATGATCATGTTAATAATCATGTTTTAAATGACATC
25 AGCTTATGACTAATAATTGATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTTA
GTTTTGAAAACAAATGAGTCATCATTAAACATGTTAATAATCGTGTATAAAGGATGACATC
ATCCACTAATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTTCGGTTTTGAAAA
ACAAATGACATCATTTCTTGATTGTGTTTTACACGTAGAATTCTACTCGTAAAGTATGTTT
AGTTTAAAAAACAAATGACATCATTTTACAGATGACATCATTTCTTGATTATGTTTTACAA
30 GTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTAAAAAACAAATGACATCATCTCTTGAT
TATGTTTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTGAAAACAAATGACA
TCATCTCTTGATTATGTTTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTGAAA
AACAAATGACATCATCCCTTGATCATGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGT
TGAATTTTGATTACAATATT

SEQ ID NO.19:

ATGCATATAATTGTGTACAAAATATGACTCATTAATCGATCGTGCGTTACAAGTAGAAT
TCTACTGGTAAAGCAAGTTCGGTTGTGAGCCGTGTGCAAAACATGACATCATAACTAATC
5 ATGTTTATAATCATGTGCAAAATATGACATCATCCGACGATTGTGTTTTACAAGTAGAATT
CTACTCGTAAAGCGAGTTTAAAAATTTTGTGACGTCAATGAAACAACGTGTAATATTTTT
TACAATATTTAAGTGAAACATTATGACTTCCAATAATTTTGTGGATGTGGATACGTTTGCA
AGACAATTGATTACAGATAAATGTAGTGCTCTAATCGAAAGATGCGGATCTGTTGCCGGC
AAACATTTTAGAGATTAGTAGAGAAAGGCCAGAGACAAGTATTTTGAGGTGCCAACTCA
10 AAAAACTATGAATACATTAATAAATATTTTACGAACAAAATATATGGACGATTCGATA
GATTATAAAGATTTTAACAGACGCATCCTATTGATAGTTTTTAAATTCGCTTTAAACAAGA
GCACCAACTACTTTCCATCGTACTAAAGAGATCATCGAGGTGGCCATTAAACGTTTAAAC
AAAATTAACCCCGATTTAAAGAGTTCTCCGCGCAATGCTTCAGCATTACAAATGAATGTT
TGGAAAATCTAGA

15

SEQ ID NO.20:

AACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACACACAATCAAGAAATGATGTCATT
TTTGTACGTGATTATAAACATGTTTAAACATGGTACATTGAACTTAATTTTGCAAGTTGA
TAAACTAGATTAATGTATGACTCATTTGTTTGTGCAAGTTGATAAACGTGATTAATATATG
20 ACTCATATGTTTGTGCAAAAATGGTGTATCGTACAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCT
ACTTGTAACACAATCGAGGGATGATGTCATTTGTAGAATGATGTCATTTGTTTTTCA
AAACCGAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACACACAATCGAGGGATGATGT
CATTTGTAGAATGATGTCATCGTACAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTAGTAAACAC

25 SEQ ID NO.21:

TTGAAAATTTATTGCCTAATATTATTTTGTGTCAGTTCGTTGTCATTTATTAATTTGGATG
ATGTCCATTTGTTTTTAAATTTGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACGCGTAAACAC
AATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACCGAACTGGC
TTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATCGAGTGGATGATGGTCATTTGTTTTTCA
30 AATCGAGATGATGTCATGTTTTGCACACGGGCTCATAAACTGCTTTACGAGTAGAATTCT
ACGTGTAACGCACGATCGATTGATGAGTCATTTGTTTTGCAATATGATATCATAAATATG
ACTCATTTGTTTTTCAAACCGAACTTGATTACGGGTAGAATTCTACTCGTAAAGCACA
ATCAAAAAGATGATGTCATTTGTTTTTCAAACCTGAACTCTCGGCTTTACGAGTAGAATT
CTACGTGTAAACACAATCAAGAAATGATGTCATTTGTTATAAAAAATAAAGCTGATGTC

ATGTTTTGCACATGGCTCATAACTAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCTACGCGTAAAAC
ATGATTGATAATTAAATAATTCATTTGCAAAGCTATACGTTAAATCAAACGGACGTTATGG
AATTGTATAATATTAATATGCAATTGATCCAACAAATAAAATTATAATAGAGCAAGTCGA
C

5 较佳的，在一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区选自 hr1。据信在一些实施方式中，所述 hr1 为分散在杆状病毒基因组中的重复序列，hr1 既是杆状病毒复制原点，又具有增强子的作用。增强作用尽管在感染初期不明显，但在感染后期，变得比较显著。在一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区 (hr) 包括 hr2。在一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区 (hr) 包括 hr3。在一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区 (hr) 包括 hr4。在
10 一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区 (hr) 包括 hr5。

在一些实施方式中，所述核酸构建体还包括杆状病毒启动子。在一些实施方式中，所述杆状病毒启动子选自多角体启动子 (pH)、Gp64、p6.9 或 p10 中的一种或几种 (例如两种，三种，或四种)。据信在一些实施方式中，所述 hr 与杆状病毒启动子顺式连接，可以促进 IE 介导的反式激活，同时 IE 会以二聚体形式与 hr1 结合，提高下游蛋白的表达量。

15 在一些实施方式中，所述核酸构建体的结构包括：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-hr1-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。在一些实施方式中，所述核酸构建体的结构为：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。

所述基因表达框包括基因及其启动子。

在一较佳实施方式中，所述核酸构建体的结构包括：pA-IE1-pH-pA-Cap-p6.9p10
20 -hr1-ITR-外源目的基因及其启动子-pA-ITR-pH-Rep-pA。在一较佳实施方式中，所述核酸构建体的结构为：pA-IE1-pH-pA-Cap-p6.9p10-hr1-ITR-外源目的基因及其启动子-pA-ITR-pH-Rep-pA。

具体的，在一些实施方式中，所述核酸构建体为腺相关病毒载体或重组杆状病毒载体。在一些实施方式中，所述核酸构建体为腺相关病毒载体。在一些实施方式中，所述核酸构建
25 体为重组杆状病毒载体。在一些实施方式中，所述重组杆状病毒载体为重组杆状病毒穿梭载体。

在一些实施方式中，所述腺相关病毒载体或重组杆状病毒载体还包括载体骨架。

在一些实施方式中，所述载体骨架可以选自市场上出售的合适载体骨架，例如 pFastBacdual、pFastBac1、pFastBacHTA、pFastBacHTB 或 pFastBacHTC 等。

30 在一种实施方式中，所述载体骨架为 pFastBacdual。

在一些实施方式中，利用所述核酸构建体包装得到的 rAAV 滴度至少为 1×10^{12} VG/mL

(例如至少为 1.5×10^{12} , 2×10^{12} , 2.5×10^{12} , 3×10^{12} , 3.5×10^{12} , 4×10^{12} , 4.5×10^{12} , 5×10^{12} , 5.5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 7.5×10^{12} , 8×10^{12} , 8.5×10^{12} , 9×10^{12} , 9.5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} , 或 1×10^{14} VG/mL), 即每 ml 病毒培养液中含有的 AAV 基因组的拷贝数至少为 1×10^{12} (例如至少为 1.5×10^{12} , 2×10^{12} , 2.5×10^{12} , 3×10^{12} , 3.5×10^{12} , 4×10^{12} , 4.5×10^{12} , 5×10^{12} , 5.5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 7.5×10^{12} , 8×10^{12} , 8.5×10^{12} , 9×10^{12} , 9.5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} , 或 1×10^{14})。

在一些实施方式中, 利用所述核酸构建体包装得到的 rAAV 滴度至少为 2.60×10^{12} VG/mL, 即每 ml 病毒培养液中含有的 AAV 基因组的拷贝数至少为 2.60×10^{12} 。

所述 rAAV 的产量通过 qPCR 方法检测, 检测步骤如下:

定量 PCR 使用的标准品为 Pvu I -HF (NEB) 单酶切线性化的 pAAV-MCS 质粒。

10 定量 PCR 使用的引物序列为:

ITR Forward primer 5'- GGAACCCCTAGTGATGGAGTT -3' (SEQ ID NO: 2)

ITR Reverse primer 5'- CGGCCTCAGTGAGCGA -3' (SEQ ID NO: 3)

定量 PCR 运行程序为: 95°C 60 s, (95°C 15 s, 60°C 30 s, 40 cycles)。根据定量 PCR 所得 CT 值和标准品浓度绘制标准品曲线后, 换算出样品滴度。

15 本发明第二方面提供一种重组杆状病毒, 所述重组杆状病毒为由任何一种所述核酸构建体经杆状病毒系统构建获得, 或由包括任一所述核酸构建体中任意元件的核酸构建体共同经杆状病毒系统构建获得。

所述的包括任一所述核酸构建体中的任意元件的核酸构建体主要是指: 包括 AAV 元件的核酸构建体、包括编码 IE 蛋白的多核苷酸的核酸构建体、包括编码杆状病毒同源区的多核苷酸。所述包括 AAV 元件的核酸构建体还可以选自包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸的核酸构建体、包括编码 Rep 蛋白的多核苷酸的核酸构建体、包括编码 AAV 顺式作用元件的核酸构建体。所述重组杆状病毒能由以上核酸构建体共同经杆状病毒系统构建获得。

20 所述的杆状病毒系统选自 Bac-to-Bac 系统 (来源于 ThermoFisher/Invitrogen)、flashBac/BacMagic 系统 (来源于 Mirus/EMD/OET/Nextgen)、BaculoDirect 系统 (来源于 ThermoFisher/Invitrogen) 或 BacPAK6/Baculogold 系统 (来源于 BD Biosciences/Clontech)。

具体的, 所述重组杆状病毒为由所述核酸构建体转化感受态细胞, 提取 Bacmid 后转染 SF9 昆虫细胞获得。

所述感受态细胞可以选自本领域各种可适用的任何感受态细胞, 只要不对本发明的发明目的产生限制即可。例如所述感受态细胞可以为 DH10Bac。

30 本发明第三方面提供一种腺相关病毒 (AAV), 所述腺相关病毒为由任何一种所述重组

杆状病毒包装获得。所述腺相关病毒可以用来治疗各种疾病，例如血友病，脊髓性肌萎缩，杜氏肌营养不良症，帕金森病，年龄相关性黄斑病变等。

本发明第四方面提供一种细胞系，所述细胞系为经任何一种所述重组杆状病毒感染的细胞系。

- 5 在一些实施方式中，所述细胞系为昆虫细胞系，例如为 SF9 细胞、SF21 细胞、High5 细胞。

本发明第五方面提供一种腺相关病毒载体系统，所述腺相关病毒载体系统包括杆状病毒系统和所述核酸构建体。

- 10 本发明第六方面提供所述核酸构建体的构建方法，所述构建方法包括将携带外源目的基因的 AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。

所述构建方法还包括将编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。

在一些实施方式中，所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件。

- 15 在一些实施方式中，所述 AAV 顺式作用元件选自反向末端重复序列（ITR 序列）。

具体的，在一些实施方式中，所述编码 IE 蛋白的多核苷酸与强启动子 pH 连接。

在一些实施方式中，所述编码杆状病毒重组同源区蛋白的多核苷酸与杆状病毒启动子顺式连接。在一些实施方式中，所述杆状病毒启动子为 p6.9 或 p10。

- 20 在一些实施方式中，所述杆状病毒载体骨架选自 pFastBacdual、pFastBac1、pFastBacHTA、pFastBacHTB 或 pFastBacHTC 等。

在一些实施方式中，所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4 或 hr5 中的一种或几种（例如两种，三种，四种或五种）。

本发明第七方面提供一种腺相关病毒的生产方法，所述生产方法包括以下步骤：将所述的重组杆状病毒感染昆虫细胞系。

- 25 所述腺相关病毒的生产方法能提高腺相关病毒的产量。

在一些实施方式中，所述细胞系选自昆虫细胞系。在一种实施方式中，所述昆虫细胞系选自 SF9 细胞。

本发明第八方面提供用一种治疗疾病的方法，所述方法包括向患者给予有效量的任何一种所述的腺相关病毒。

- 30 在一些实施方式中，所述疾病包括例如血友病、脊髓性肌萎缩、杜氏肌营养不良症、帕

金森病、年龄相关性黄斑病变等。

本发明还包括以下任何编号的段落：

- 1、核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体包括：AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸，所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件。
5
- 2、根据段落 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸。
- 3、根据段落 2 所述的核酸构建体，其特征在于，所述 IE 蛋白选自 Acie0、Acie01 或 Acie02 中的一种或几种编码的蛋白，和/或，所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4
10 或 hr5 中的一种或几种。
- 4、根据段落 1-3 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括 IE 蛋白基因的启动子，所述 IE 蛋白基因的启动子选自 Gp64、pH、p6.9 或 p10 中的一种或几种。
- 5、根据段落 1-4 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括杆状病毒启动子，所述杆状病毒启动子与杆状病毒重组同源区连接，所述杆状病毒启动子优选为
15 pH、Gp64、p6.9 或 p10 中的一种或几种。
- 6、根据段落 1-5 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述 AAV 顺式作用元件选自 ITR 序列。
- 7、根据段落 1-6 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括外源目的基因，所述外源目的基因嵌入 AAV 元件中。
- 20 8、根据段落 1-7 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体的结构为：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。
- 9、根据段落 1-8 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1。
- 10、根据段落 1-9 任一所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体为腺相关病毒载体
25 或重组杆状病毒载体，所述重组杆状病毒载体优选为重组杆状病毒穿梭载体。
- 11、一种重组杆状病毒，其特征在于，所述重组杆状病毒为由段落 1-10 任一所述的核酸构建体经杆状病毒系统构建获得，或由包括段落 1-10 任一所述核酸构建体中任意元件的核酸构建体共同经杆状病毒系统构建获得。
- 12、一种腺相关病毒，其特征在于，所述腺相关病毒为由段落 11 所述的重组杆状病毒感染
30 细胞后包装获得。

- 13、一种细胞系，其特征在于，所述细胞系为经段落 11 所述重组杆状病毒感染的细胞系。
- 14、一种腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述腺相关病毒载体系统包括杆状病毒系统和段落 1-10 任一所述的核酸构建体。
- 15、一种构建段落 1-10 任一所述核酸构建体的方法，其特征在于，所述构建方法包括将携带外源目的基因的 AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。
- 16、根据段落 15 所述的构建方法，其特征在于，所述构建方法包括以下特征中的一项或几项：
- 1) 所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件，所述 AAV 顺式作用元件优选为 ITR 序列；
 - 2) 所述 IE 蛋白由 Acie0、Acie01 或 Acie02 基因中的一种或几种编码；
 - 3) 所述杆状病毒载体骨架选自 pFastBacdual、pFastBac1、pFastBacHTA、pFastBacHTB 或 pFastBacHTC 中的一种；
 - 4) 所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4 或 hr5 中的一种或几种；
 - 5) 将编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。
- 17、一种腺相关病毒的生产方法，其特征在于，所述生产方法包括以下步骤：将段落 11 所述的重组杆状病毒感染昆虫细胞系。

以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

以下实施例以 EGFP 为外源目的基因为例。

实施例 1 重组杆状病毒穿梭载体的构建及重组杆状病毒的获得

确定相关基因：Cap 和 Rep 蛋白的基因均来源于 AAV2 基因组(GenBank: AF043303.1)，根据核糖体泄露扫描机制参考文献 (Smith RH, Levy JR, Kotin RM: A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. Mol Ther 2009, 17(11):1888-1896.) 对其中碱基进行点突变；Acie01 (GenBank: NC_001623.1)，杆状病毒重组同源区 hr1 (GenBank: M14313.1)。

委托基因公司分别合成相应序列：Cap 基因序列 (核苷酸序列 SEQ ID NO: 4)，Rep 基因序列 (核苷酸序列 SEQ ID NO: 5)，hr1 和 p6.9、p10 启动子组合 (hr1p6.9p10，核苷酸序列 SEQ ID NO: 6)，pH 启动子和 Acie01 组合 (pH-Acie01，核苷酸序列 SEQ ID NO: 7)。使用本领域熟知的同源重组方法将上述序列以及 pAAV-EGFP 载体 (康霖生物科技 (杭州) 有限公司改造) 中的 ITR-CMV-EGFP 序列克隆至 pFastBacdual (Invitrogen) 上，测序鉴定后分别得到 pFBd-Cap-ITR-Rep (图 1 和图 2，核苷酸序列 SEQ ID NO: 8) 和 pFBd-IE-hr1Cap-ITR-Rep (图 3 和图 4，核苷酸序列 SEQ ID NO: 9) 两个重组杆状病毒穿梭载体。

SEQ ID NO.4-9 的序列如下所示：

15 SEQ ID NO: 4:

ACGGCTGCCGACGGTTATCTACCCGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATA
AGACAGTGGTGGAAAGCTCAAACCCGGCCACCACCACAAAGCCCGCAGAGCGGCATA
AGGACGACAGCAGGGGCCTTGTGCTTCCCGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGG
ACTGGACAAGGGAGAGCCGGTGAACGAGGCAGACGCCGCTGCCCTCGAGCACGACAA
20 AGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCCTACCTCAAGTACAACCACGCC
GACGCGGAGTTCCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGAC
GAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACC
TGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGAC
TCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTG
25 GTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGC
AGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAG
ACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCC
ACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGGCCCTGCCACCTA
CAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATCACT
30 ACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTT
CACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGACCCAAGAGACT
CAACTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGAATGACGGTACGACGA
CGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCC

CGTACGTCCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCCAGCAGACGTCTTC
ATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGTAGGACGCTC
TTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTTAC
CTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTCCCTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTC
5 TGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACA
CTCCAAGTGGAACCAACACGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCGAGTGA
CATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCCTGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTAT
CAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTAC
CACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGGCGATGGCAAGCCACAAGG
10 ACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCA
GAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGA
CAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGC
AACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCT
GGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGA
15 CGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTTCGGACTTAAACACCCTCCTCCACA
GATTCTCATCAAGAACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAA
AGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGG
GAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAACT
ACAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTC
20 GCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAA

SEQ ID NO: 5:

CTGGCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTG
CCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAGTGGGAGTTGCCGC
25 CAGATTCTGACTTGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAG
CTGCAGCGGACTTTCTGACGGAGTGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGAGGCCCTTTT
CTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACTTACACGTGCTCGTGAAACCA
CCGGGGTGAAATCCTTAGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTCGCGAAAACTGATT
CAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTTCGCGGTCACAAAGA
30 CCAGAAACGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGACGAGTGCTACATCCCCAATTA
CTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATTTAGAACAGTATT
TAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCAC
GTGTGCGCAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGACGCGCCGG
TGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTTCGGGTGGCTCGTGGACAA

GGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATACAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCA
ATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATT
ATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACA
TTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGG
5 CTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTG
TTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCC
CTTCTACGGGTGCGTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGGACA
AGATGGTGTCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAA
AGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCCAG
10 ATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGG
GAACTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAA
CTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACT
TTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAG
GGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCCAAACGGG
15 TGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCATCGATCAACTACGC
AGACAGGTACCAAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCT
GCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAA
GACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGC
GTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGC
20 CTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAA

SEQ ID NO: 6:

ATCGATGTTGACCCCAACAAAAGATTTATAATTAATCATAATCACGAACAACAACAA
GTCAATGAAACAAATAAACAAGTTGTCGATAAAACATTCATAAATGACACAGCAACATA
25 CAATTCTTGACATAATAAAAATTTAAATGACATCATATTTGAGAATAACAAATGACATTATC
CCTCGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTACCCGTAAAGCGAGTTTAGTTTTGAAAAACA
AATGACATCATTTGTATAATGACATCATCCCCTGATTGTGTTTTACAAGTAGAATTCTATCC
GTAAAGCGAGTTCAGTTTTGAAAACAAATGAGTCATACCTAAACACGTTAATAATCTTCT
GATATCAGCTTATGACTCAAGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGAGATAAGTTTATGACA
30 TCATCCACTGATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCCAGTTCGGTTATGAG
CCGTGTGCAAAACATGACATCAGCTTATGACTCATACTTGATTGTGTTTTACGCGTAGAA
TTCTACTCGTAAAGCGAGTTCGGTTATGAGCCGTGTGCAAAACATGACATCAGCTTATGA
GTCATAATTAATCGTGCGTTACAAGTAGAATTCTACTCGTAAAGCGAGTTGAAGGATCAT
ATTAGTTGCGTTTATGAGATAAGATTGAAAGCACGTGTAAAATGTTTCCCGCGCGTTGG

CACAACTATTTACAATGCGGCCAAGTTATAAAAGATTCTAATCTGATATGTTTTAAAACAC
CTTTGCGGCCCGAGTTGTTTGCGTACGTGACTAGCGAAGAAGATGTGTGGACCGCAGAA
CAGATAGTAAAACAAAACCCTAGTATTGGAGCAATAATCGATGACGTCGCTGACGTAGC
GCTTTGAATTCGCGCGCTTCGGACCGGGATCGTGACCAAATTCGGTTTTGCGACGATG
5 CAGAGTTTTTTGAACAGGCTGCTCAAACACATAGATCCGTACCCGCTCAGTCGGATGTATT
ACAATGCAGCCAATACCATGTTTTACACGACTATGGAAAACCTATGCCGTGTCCAATTGCA
AGTTCAACATTGAGGATTACAATAACATATTTAAGGTGATGGAAAATATTAGGAAACACA
GCAACAAAAATTCAAACGACCAAGACGAGTTAAACATATATTTGGGAGTTCAGTCGTCG
AATGCAAAGCGTAAAAAATATTAATAAGGTAAAAATTACAGCTACATAAATTACACAATT
10 TAAACTGCAGTCTGGAGATACGGACCTTTAATTCAACCCAACACAATATATTATAGTTAAA
TAAGAATTATTATCAAATCATTTGTATATTAATTAATAATACTATACTGTAAATTACATTTTAT
TTACAATC

SEQ ID NO: 7:

15 AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATC
TTATCATGTCTGGATCTGATCACTGCTTGAGCCTAGGAGATCCGATCATGGAGATAATTAA
AATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAAATA
AAAAACCTATAAATATTCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCATGATCCGTAC
20 ATCCAGCCACGTCCTGAACGTCCAAGAAAACATCATGACTTCCAACCTGTGCTTCCAGCC
CCTACTCCTGTGAGGCCACTTCAGCCTGCGCTGAGGCCAGCAACTGCAGGTGGACAC
AGGTGGCGATAAGATCGTGAACAACCAGGTCACCATGACTCAAATCAACTTCAACGCTT
CCTACACCTCTGCCAGCACTCCCTCTCGTGCTAGCTTCGACAACCTCATACTCGGAGTTCT
GCGACAAGCAACCTAACGATTACTTGTCTTACTACAACCACCCAACCCCGGACGGAGCT
25 GATACTGTCTATCTCCGACTCTGAAACCGCTGCCGCTAGCAACTTCCTCGCCTCAGTTAAC
TCGCTCACTGACAACGATTTGGTGGAGTGTCTGCTCAAGACCACTGACAACCTGGAGG
AAGCTGTGTCCTCTGCCTACTACAGCGAGTCACTCGAACAGCCAGTGGTGAACAACCC
TCTCCTAGCTCAGCTTACCACGCCGAGTCCTTCGAACACTCTGCTGGTGTCAACCAGCC
GTCCGCCACAGGCACCAAGAGGAAGTTGGACGAGTACCTGGATAACTCCAGGGAGTT
30 GTGGGTCAATTCAACAAGATCAAGTTGAGACCTAAGTACAAGAAGAGCACCATCCAGT
CATGCGCTACACTGGAACAAACCATCAACCACAACACTAACATCTGTACAGTGGCTTCC
ACCCAGGAGATCACTCACTACTTCACAAACGACTTCGCCCCCTACCTGATGAGGTTTGA
CGATAACGACTACAACCTCGAACAGATTCTCCGATCACATGTCTGAAACCGGTTACTACAT
GTTTCGTCGTAAAGAAGTCCGAGGTGAAGCCTTTCGAAATCATCTTCGCCAAGTACGTCT

CTAACGTGGTCTACGAGTACACAACTACTACATGGTTGACAACCGTGTGTTTCGTT
GTGACCTTCGATAAGATCCGCTTCATGATCAGCTACAACCTGGTTAAGGAGACTGGCATC
GAAATCCCACACTCACAGGACGTCTGCAACGATGAGACCGCCGCTCAAACTGCAAGA
AGTGTCACTTCGTGGACGTCCACCACACATTCAAGGCCGCTCTGACCTCCTACTTCAAC
5 CTCGATATGTACTACGCTCAGACAACCTTCGTGACCTTGCTGCAATCACTCGGCGAGCGT
AAGTGTGGATTCTTCTTGTGCAAGTTGTACGAGATGTACCAGGACAAGAACCTCTTCAC
TTTGCCCATCATGCTGAGCCGCAAGGAATCAAACGAGATCGAAACCGCCTCTAACAACT
TCTTCGTCTCGCCATACGTTTCCCAGATCCTCAAGTACTCGGAGTCCGTCCAATTCCCGG
ACAACCCTCCCAACAAGTACGTGCTTGATAACCTGAACCTCATCGTGAACAAGAAGAGC
10 ACTCTGACATACAAGTACTCGTCCGTCGCTAACCTGCTCTTCAACAACCTACAAGTACCAC
GACAACATCGCTTCTAACAACAACGCCGAGAACCTCAAGAAGGTCAAGAAGGAAGAC
GGAAGCATGCACATCGTTGAGCAGTACTTGACTCAAAACGTCGATAACGTTAAGGGTCA
CAACTTCATCGTGTTGTCCTTCAAGAACGAGGAAAGGCTGACCATCGCTAAGAAGAAC
AAGGAGTTCTACTGGATCTCTGGCGAAATCAAGGACGTTGATGTGAGCCAGGTCATCCA
15 AAAGTACAACAGATTCAAGCACCACATGTTTCGTGATCGGCAAGGTCAACCGTCGCGAGT
CAACTACACTGCACAACAACCTTGCTGAAGCTCTTGGCCTTGATCCTGCAGGGACTGGTG
CCACTCTCCGACGCCATCACATTCGCCGAGCAAAAGCTCAACTGCAAGTACAAGAAGTT
CGAGTTCAACTAA

20 SEQ ID NO: 8:

TTCTCTGTACAGAAATGAAAATTTTTCTGTATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTG
ACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGC
GCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
CCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCC
25 CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAAC
TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAA
30 ATATTAACGTTTACAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATT
CCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG

CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCG
CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
5 TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
AACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGG
AGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
10 GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGT
CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGG
ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGT
15 TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC
TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
ACCAAATACTGTCCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
20 GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCG
GCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
GAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCG
GACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA
GGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
25 CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATC
CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCG
GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGG
30 CAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGAC
AATAAAGTCTTAACTGAACAAAATAGATCTAACTATGACAATAAAGTCTTAACTAGA
CAGAATAGTTGTAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTT
GTTATGGCTAAAGCAAACCTCTTCATTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCCGTCGTATTAAAGAG
GGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAAC

AACTCCGCGGCCGGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGG
GTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGC
GGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCT
CATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCCTCCGGTGCTCGCCGGAG
5 ACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTA
AGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCTGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTC
TTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGC
TACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTGACTTGGT
CAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAG
10 GCGGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAAC
ATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCCGAGGCATAGACTG
TACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGC
GTTCCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
15 CACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACG
AGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACG
GCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGTAGACCTCGGCCGTCG
CGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGA
AGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCCTACGTA
20 CCCGTAGTGGCTATGGCAGGGCTTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTC
ACCCGAACTTGGGGGTTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGTCCCAA
TGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATG
AACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGG
TTCCTTCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGGTACCGCA
25 TGCTTACAGATTACGAGTCAGGTATCTGGTGCCAATGGGGCGAGGCTCTGAATACACGC
CATTAGTGTCCACAGTAAAGTCCACATTAACAGACTTGTTGTAGTTGGAAGTGTACTGAA
TTTCGGGATTCCAGCGTTTGCTGTTTTCTTCTGCAGCTCCCACTCGATCTCCACGCTGA
CCTGTCCCGTGGAGTACTGTGTGATGAAGGAAGCAAACCTTGCCGCACTGAAGGTGGTC
GAAGGATTTCGACAGGTACCGGGGTGTTCTTGATGAGAATCTGTGGAGGAGGGTGTTTAAG
30 TCCGAATCCACCCATGAGGGGAGAGGGGTGAAAATGTCCGTCCGTGTGTGGAATCTTTG
CCCAGATGGGCCCCTGAAGGTACACATCTCTGTCCTGCCAGACCATGCCTGGAAGAACG
CCTTGTGTGTTGACATCTGCGGTAGCTGCTTGTCTGTTGCCCTCTCTGGAGGTTGGTAGAT
ACAGAACCATACTGCTCCGTAGCCACGGGATTGGTTGTCCTGATTTCTCTTCGTCTGTA
ATCATGACCTTTTCAATGTCCACATTTGTTTTCTCTGAGCCTTGCTTCCCAAAGATGAGA

ACCCCGCTCTGAGGAAAAAACTTTTCTTCATCGTCCTTGTGGCTTGCCATCGCCGGGCC
CGGATTCACCAGAGAGTCTCTGCCATTGAGGTGGTACTTGGTAGCTCCAGTCCACGAGT
ATCACTGTTGTTGTTATCCGCAGATGTCTTTGATACTCGCTGCTGGCGGTAACAGGGTC
CAGGAAGCCAGTTCCTAGACTGGTCCCGAATGTCACTCGCTCCGGCCTGAGAAAACTG
5 AAGCCTTGACTGCGTGGTGGTTCCTACTTGGAGTGTGTTCTGCTCAAGTAATACAGGTA
CTGGTCGATGAGAGGATTCATGAGACGGTCCAGACTCTGGCTGTGAGCGTAGCTGCTGT
GGAAAGGAACGTCCTCAAAAGTGTAGCTGAAGGTAAAGTTGTTTCCGGTACGCAGCAT
CTGAGAAGGAAAGTACTCCAGGCAGTAAAATGAAGAGCGTCCTACTGCCTGACTCCCG
TTGTTACAGGGTGAGGTATCCATACTGTGGCACCATGAAGACGTCTGCTGGGAACGGCGG
10 GAGGCATCCTTGATGCGCCGAGCCGAGGACGTACGGGAGCTGGTACTCCGAGTCAGTA
AACACCTGAACCGTGCTGGTAAGGTTATTGGCAATCGTCGTCGTACCGTCATTCTGCGTG
ACCTCTTTGACTTGAATGTAAAGAGCTTGAAGTTGAGTCTCTTGGGTGCGAATCCCCA
GTTGTTGTTGATGAGTCTTTGCCAGTCACGTGGTGAAAAGTGGCAGTGGAATCTGTTGA
AGTCAAAATACCCCCAAGGGGTGCTGTAGCCAAAGTAGTGATTGTCGTTTCGAGGCTCCT
15 GATTGGCTGGAAATTTGTTTGTAGAGGTGGTTGTTGTAGGTGGGCAGGGCCCAGGTTTCG
GGTGCTGGTGGTGATGACTCTGTGCCCCATCCATGTGGAATCGCAATGCCAATTTCCCGA
GGAATTACCCACTCCGTCGGCGCCCTCGTTATTGTCTGCCATTGGTGCGCCACTGCCTGT
AGCCATCGTATTAGTTCCCAGACCAGAGGGGGCTGCTGGTGGCTGTCCGAGAGGCTGGG
GGTCAGGTACTGAGTCTGCGTCTCCAGTCTGACCAAAATTCAATCTTTTTCTTGCAGGCT
20 GCTGGCCCCGCTTTCCGGTTCCCAGAGGAGTCTGGCTCCACAGGAGAGTGCTCTACC
GGCCTCTTTTTTCCCGGAGCCGTCTTAACAGGTTCCCTCAACCAGGCCAGAGGTTCAAG
AACCCTCTTTTTTCGCTGGAAGACTGCTCGTCCGAGGTTGCCCCCAAAGACGTATCTT
CTTTAAGGCGCTCCTGGAACCTCCGCGTCGGCGTGGTTGTACTTGAGGTAAGGGTTGTCT
CCGCTGTCGAGCTGCCGGTCGTAGGCTTTGTCGTGCTCGAGGGCAGCGGCGTCTGCCTC
25 GTTCACCGGCTCTCCCTTGTCCAGTCCGTTGAAGGGTCCGAGGTACTTGTACCCGGGAA
GCACAAGGCCCTGCTGTGTCCTTATGCCGCTCTGCGGGCTTTGGTGGTGGTGGGCCG
GGTTTGAGCTTCCACCACTGTCTTATTCCTTCAGAGAGAGTGTCTCGAGCCAATCGGGT
AGATAACCGTCGGCAGCCGTGGCGGCGCTAGCACCATGGCTCGAGATCCCGGGTGATCA
AGTCTTCGTCGAGTGATTGTAAATAAAATGTAATTTACAGTATAGTATTTAATTAATATAC
30 AAATGATTTGATAATAATTCTTATTTAACTATAATATATTGTGTTGGGTTGAATTAAAGGTC
CGTATACGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAAATACC
GCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCT
CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG

TTCCTACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC
CCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
5 ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTTGA
CTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
10 GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGAT
CCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG
TGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC
ACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCA
15 GTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGC
CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACA
GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
20 GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC
CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGTGACGTTTTATTT
GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGA
25 TGCTATTGCTTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGC
ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGTTTAAACAGG
AACCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
GGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
CTGCCTGCAGGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
30 CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC
GCTCGCGGCCGCTCTAGAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAA
TAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAAATAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTA
TTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCCGCGCCCTGGCGGGGTTTTTACGAGATTGT
GATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCCGCATTTCTGACAGCTTTGTGA

ACTGGGTGGCCGAGAAGGAGTGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACTTGGATCTGAATCTG
ATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAGT
GGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGA
GAGCTACTTCCACTTACACGTGCTCGTGGAACCACCGGGGTGAAATCCTTAGTTTTGG
5 GACGTTTCCTGAGTCAGATTCGCGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAG
CCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTACAAAAGACCAGAAACGGCGCCGGAGGCGGG
AACAAGGTGGTGGACGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGA
GCTCCAGTGGGCGTGGACTAATTTAGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGA
GCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAGCAGAAC
10 AAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGACGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAG
GTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGG
ATACAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCA
AATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCG
ACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTT
15 TGGAATAAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACG
AAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGA
CCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACC
AATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGG
GGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGT
20 GCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCA
CCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAACACCA
GCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACT
TTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGT
GGTTGAGGTGGAGCATGAATCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCC
25 CCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCAT
CGACGTCAGACGCGGAAGCATCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTC
TCGTACAGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATC
AGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGT
CAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATC
30 ATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGG
ATGACTGCATCTTTGAACAATAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGACAAGCTTGTGCGAGAAGT
ACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCC
TCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAG

CATTTTTTTCACCTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
TGGATCTGATCACTGCTTGAGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCA
AACTATTTTGTCAATTTTAAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTAT
TTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAACTCCATTTCCACCCCTCCAGTTCCCAAC
5 TATTTTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTCTTCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTG
CCAACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTT

SEQ ID NO: 9:

TTCTCTGTCACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAATTG
10 ACTGAATATCAACGCTTATTTGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGC
GCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
CCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCC
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
15 GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAAC
TGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAA
ATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
20 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATT
CCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
25 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC
ATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
30 AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGG
AGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGT

CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGG
ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGT
TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC
TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTG
5 CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
ACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCG
GCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
10 GAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCG
GACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA
GGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATC
15 CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCG
GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGG
CAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGAC
AATAAAGTCTTAAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAAACTAGA
20 CAGAATAGTTGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTT
GTTATGGCTAAAGCAAACCTCTTCATTTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCGTCGTATTAAAGAG
GGGCGTGGCCAAGGGCATGGTAAAGACTATATTCGCGGCGTTGTGACAATTTACCGAAC
AACTCCGCGGCCGGAAGCCGATCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGG
GTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTGC
25 GGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGACGTCAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCT
CATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAG
ACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCAGAACGTA
AGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTC
TTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGC
30 TACGTCTCCGAACCTACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGT
CAGGGCCGAGCCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAG
GGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAAC
ATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTG
TACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGC

GTTCCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGTTTAC
GAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGT
CACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCGAACG
AGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTACG
5 GCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGTAGACCTCGGCCGTGCG
CGGCGCTTGCCGGTGGTGCTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGA
AGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCCAGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCCTACGTA
CCCGTAGTGGCTATGGCAGGGCTTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTC
ACCCGAACCTGGGGGTTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGTCCCAA
10 TGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATG
AACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGG
TTCCTTCGGTATTGTCTCCTTCCTGTTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGGTACCGCA
TGCCTTAGTTGAACTCGAACTTCTTGTACTTGCAGTTGAGCTTTTGCTCGGCGAATGTGA
TGGCGTCGGAGAGTGGCACCAGTCCCTGCAGGATCAAGGCCAAGAGCTTCAGCAAGTT
15 GTTGTGCAGTGTAGTTGACTCGCGACGGTTGACCTTGCCGATCACGAACATGTGGTGCT
TGAATCTGTTGTACTTTTGGATGACCTGGCTCACATCAACGTCCTTGATTTCGCCAGAGA
TCCAGTAGAACTCCTTGTCTTCTTAGCGATGGTCAGCCTTTCCTCGTTCTTGAAGGACA
ACACGATGAAGTTGTGACCCTTAACGTTATCGACGTTTTGAGTCAAGTACTGCTCAACGA
TGTGCATGCTTCCGTCTTCCTTCTTGACCTTCTTGAGGTTCTCGGCGTTGTTGTTAGAAG
20 CGATGTTGTCGTGGTACTTGTAGTTGTTGAAGAGCAGGTTAGCGACGGACGAGTACTTG
TATGTCAGAGTGCTCTTCTTGTTACGATGAGGTTTCAGGTTATCAACGACGTAAGTTG
GGAGGGTTGTCCGGGAATTGGACGGACTCCGAGTACTTGAGGATCTGGGAAACGTATG
GCGAGACGAAGAAGTTGTTAGAGGCGGTTTCGATCTCGTTTGATTCTTGCGGCTCAGC
ATGATGGGCAAAGTGAAGAGGTTCTTGTCTGGTACATCTCGTACAACCTTCGACAAGAG
25 GAATCCACACTTACGCTCGCCGAGTGATTGCAGCAAGGTCACGAAGGTTGTCTGAGCGT
AGTACATATCGAGGTTGAAGTAGGAGGTCAGAGCGGCCTTGAATGTGTGGTGGACGTCC
ACGAAGTGACACTTCTTGCAGTTTTGAGCGGCGGTCTCATCGTTGCAGACGTCCTGTGA
GTGTGGGATTTTCGATGCCAGTCTCCTTAACCAGGTTGTAGCTGATCATGAAGCGGATCTT
ATCGAAGGTCACAACGAACACACGGTTGTCAACCATGTAGTAGTTGTTTGTGTACTCGT
30 AGACCACGTTAGAGACGTACTTGGCGAAGATGATTCGAAAGGCTTCACCTCGGACTTC
TTAACGACGAACATGTAGTAACCGGTTTCAGACATGTGATCGGAGAATCTGTTTCGAGTT
GTAGTCGTTATCGTCGAACCTCATCAGGTAGGGGGCGAAGTCGTTTGTGAAGTAGTGAG
TGATCTCCTGGGTGGAAGCCACTGTACAGATGTTAGTGTTGTGGTTGATGGTTTGTTCOA
GTGTAGCGCATGACTGGATGGTGCTCTTCTTGTACTTAGGTCTCAACTTGATCTTGTTGA

ATTGACCCACAACCTCCCTGGGAGTTATCCAGGTACTCGTCCAACCTCCTCTTGGTGCCTG
TGGCCGACGGCTGGTTGACACCAGCAGAGTGTTCGAAGGACTCGGCGTGGTAAGCTGA
GCTAGGAGAGGGTTGTTTCGACCACTGGCTGTTTCGAGTGACTCGCTGTAGTAGGCAGAG
GACACAGCTTCCTCCAGGTTGTCAGTGGTCTTGAGCAGACACTCCACCAAATCGTTGTC
5 AGTGAGCGAGTTAACTGAGGCGAGGAAGTTGCTAGCGGCAGCGGTTTCAGAGTCGGAG
ATGACAGTATCAGCTCCGTCCGGGGTTGGGTGGTTGTAGTAAGACAAGTAATCGTTAGG
TTGCTTGTCTGCAGAACTCCGAGTATGAGTTGTCTGAAGCTAGCACGAGAGGGAGTGCTG
GCAGAGGTGTAGGAAGCGTTGAAGTTGATTTGAGTCATGGTGACCTGGTTGTTACGAT
CTTATCGCCACCTGTGTCCACCTGCAGTTGCTGGGCCTCAGCGCAGGCTGAAGTGGCCT
10 CACAGGAGTAGGGGCTGGAAGCACAGTTGGAAGTCATGATGTTTTCTTGGACGTTACAGG
ACGTGGCTGGATGTACGGATCATGCGCCCGATGGTGGGACGGTATGAATAATCCGGAATA
TTTATAGGTTTTTTTTATTACAAAACCTGTTACGAAAACAGTAAAATACTTATTTATTTGCGA
GATGGTTATCATTTTAATTATCTCCATGATCGGATCTCCTAGGCTCAAGCAGTGATCAGAT
CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAA
15 AAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCA
ATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTTGTCTAGTACTTCTCGACGGTACCGCATGCT
ATGCATCAGCTGCTAGCACCATGGCTCGAGTTACAGATTACGAGTCAGGTATCTGGTGCC
AATGGGGCGAGGCTCTGAATACACGCCATTAGTGTCCACAGTAAAGTCCACATTAACAG
ACTTGTGTAGTTGGAAGTGACTGAATTTCTGGGATTCCAGCGTTTGCTGTTTTCTTCT
20 GCAGCTCCCACTCGATCTCCACGCTGACCTGTCCCGTGGAGTACTGTGTGATGAAGGAA
GCAAACCTTTGCCGCACTGAAGGTGGTCGAAGGATTCGCAGGTACCGGGGTGTTCTTGAT
GAGAATCTGTGGAGGAGGGTGTTTAAGTCCGAATCCACCCATGAGGGGAGAGGGGTGA
AAATGTCCGTCCGTGTGTGGAATCTTTGCCCAGATGGGCCCCTGAAGGTACACATCTCTG
TCCTGCCAGACCATGCCTGGAAGAACGCCTTGTGTGTTGACATCTGCGGTAGCTGCTTG
25 TCTGTTGCCTCTCTGGAGGTTGGTAGATACAGAACCATACTGCTCCGTAGCCACGGGATT
GGTTGTCCTGATTTCTCTTCGTCTGTAATCATGACCTTTTCAATGTCCACATTTGTTTTCT
CTGAGCCTTGCTTCCCAAAGATGAGAACCCCGCTCTGAGGAAAAAACTTTTCTTCATCG
TCCTTGTTGGCTTGCCATCGCCGGGGCCCGGATTCACCAGAGAGTCTCTGCCATTGAGGTG
GTAATTGGTAGCTCCAGTCCACGAGTATTCAGTGTGTTGTTATCCGCAGATGTCTTTGAT
30 ACTCGCTGCTGGCGGTAACAGGGTCCAGGAAGCCAGTTCCTAGACTGGTCCCGAATGTC
ACTCGCTCCGGCCTGAGAAAACTGAAGCCTTGACTGCGTGGTGGTTCCACTTGGAGTGT
TTGTTCTGCTCAAGTAATACAGGTACTGGTCGATGAGAGGATTCATGAGACGGTCCAGA
CTCTGGCTGTGAGCGTAGCTGCTGTGGAAAGGAACGTCTCAAAAAGTGTAGCTGAAGG
TAAAGTTGTTTCCGGTACGCAGCATCTGAGAAGGAAAGTACTCCAGGCAGTAAAATGAA

GAGCGTCCTACTGCCTGACTCCCGTTGTTTCAGGGTGAGGTATCCATACTGTGGCACCATG
AAGACGTCTGCTGGGAACGGCGGGAGGCATCCTTGATGCGCCGAGCCGAGGACGTACG
GGAGCTGGTACTCCGAGTCAGTAAACACCTGAACCGTGCTGGTAAGGTTATTGGCAATC
GTCGTCGTACCGTCATTCTGCGTGACCTCTTTGACTTGAATGTTAAAGAGCTTGAAGTTG
5 AGTCTCTTGGGTCGGAATCCCCAGTTGTTGTTGATGAGTCTTTGCCAGTCACGTGGTGA
AAAGTGGCAGTGGAATCTGTTGAAGTCAAAATACCCCCAAGGGGTGCTGTAGCCAAAG
TAGTGATTGTCGTTTCGAGGCTCCTGATTGGCTGGAAATTTGTTTGTAGAGGTGGTTGTTG
TAGGTGGGCAGGGCCCAGGTTCTGGGTGCTGGTGGTGATGACTCTGTCGCCCATCCATGT
GGAATCGCAATGCCAATTTCCCGAGGAATTACCCACTCCGTCGGCGCCCTCGTTATTGTC
10 TGCCATTGGTGCGCCACTGCCTGTAGCCATCGTATTAGTTCCCAGACCAGAGGGGGCTG
CTGGTGGCTGTCCGAGAGGCTGGGGGTCAGGTACTGAGTCTGCGTCTCCAGTCTGACCA
AAATTCAATCTTTTTCTTGCAGGCTGCTGGCCCGCCTTTCCGGTTCCCGAGGAGGAGTCT
GGCTCCACAGGAGAGTGCTCTACCGGCCTCTTTTTTCCCGGAGCCGTCTTAACAGGTTC
CTCAACCAGGCCAGAGGTTCAAGAACCCTCTTTTTTCGCTGGAAGACTGCTCGTCCGA
15 GGTTGCCCCCAAAGACGTATCTTCTTTAAGGCGCTCCTGGAACCTCCGCGTCGGCGTGG
TTGTACTTGAGGTAAGGGTTGTCTCCGCTGTGAGCTGCCGGTCGTAGGCTTTGTCGTGC
TCGAGGGCAGCGGCGTCTGCCTCGTTCACCGGCTCTCCCTTGTCAGTCCGTTGAAGGG
TCCGAGGTACTTGTACCCGGGAAGCACAAGGCCCTGCTGTCGTCCTTATGCCGCTCTG
CGGGCTTTGGTGGTGGTGGGCCGGGTTTGAGCTTCCACCACTGTCTTATTCCTTCAGAG
20 AGAGTGTCTCGAGCCAATCGGGTAGATAACCGTCGGCAGCCGTGGCGGCTCAAGTCTT
CGTCGAGTGATTGTAAATAAAATGTAATTTACAGTATAGTATTTTAATTAATATACAAATGA
TTTGATAATAATTCTTATTTAACTATAATATATTGTGTTGGGTTGAATTAAGGTCCGTATCT
CCAGACTGCAGTTTAAATTGTGTAATTTATGTAGCTGTAATTTTACCTTATTAATATTTTTT
ACGCTTTGCATTCGACGACTGAACTCCCAAATATATGTTTAACTCGTCTTGGTCGTTTGAA
25 TTTTTGTTGCTGTGTTTCCTAATATTTCCATCACCTTAAATATGTTATTGTAATCCTCAATG
TTGAACTTGCAATTGGACACGGCATAGTTTTCCATAGTCGTGTAAAACATGGTATTGGCT
GCATTGTAATACATCCGACTGAGCGGGTACGGATCTATGTGTTTGAGCAGCCTGTTCAAA
AACTCTGCATCGTCGCAAAACGGAATTTGGTCACGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAAT
TCAAAGCGCTACGTCAGCGACGTCATCGATTATTGCTCCAATACTAGGGTTTTGTTTTACT
30 ATCTGTTCTGCGGTCCACACATCTTCTTCGCTAGTCACGTACGCAAACAACCTCGGGCCGC
AAAGGTGTTTTTAAACATATCAGATTAGAATCTTTTATAACTTGGCCGCATTGTAAATAGT
TGTGCCAACGCGCGGGAAACATTTTACACGTGCTTTCAATCTTATCTCATAAACGCAACT
AAATATGATCCTTCAACTCGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATTAATTAT
GACTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACCGAACTCGCTTTACGAGTA

GAATTCTACGCGTAAACACAATCAAGTATGAGTCATAAGCTGATGTCATGTTTTGCACA
CGGCTCATAACCGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTACTTGTAACGCACGATCAGTGGA
TGATGTCATAAACTTATCTCATGTTTTGCACACGGCTCATAACTTGAGTCATAAGCTGATA
TCAGAAGATTATTAACGTGTTTAGGTATGACTCATTTGTTTTCAAACTGAACTCGCTTTA
5 CGGATAGAATTCTACTTGTAACACAATCAGGGGATGATGTCATTATACAAATGATGTCA
TTTGTTTTTCAAACTAACTCGCTTTACGGGTAGAATTCTACTTGTAACACAATCGA
GGGATAATGTCATTTGTTATTCTCAAATATGATGTCATTTAAATTTTATTATGCAAGAATT
GTATGTTGCTGTGTCATTTATGAATGTTTTATCGACAACCTGTTTATTTGTTTCATTGACTT
GTTGTTGTTTCGTGATTATGATTAATTATAAATCTTTTGTGGGGTCAACATCGATGTATACG
10 CCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCT
CACTGAGGCCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTACG
CGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
15 GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA
TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT
CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
20 CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGG
GATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCG
CTACCGGTGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCA
25 TCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
CTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAG
CCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGA
30 GGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAAC
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATC
GGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA

GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGC
CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGTCGACGTTTATTTGTGAAATTT
GTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGC
TTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTT
5 ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGTTTAAACAGGAACCCCTA
GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
AAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC
AGGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCGCGG
10 CCGCTCTAGAGATCATGGAGATAATTAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTT
TACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTATAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACC
GTCCCACCATCGGGCGCGGATCCGCCGCCCTGGCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAG
GTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCCGGCATTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGT
GGCCGAGAAGGAGTGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACTTGGATCTGAATCTGATTGAGC
15 AGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAGTGGCGCCG
TGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACT
TCCACTTACACGTGCTCGTGGAACCACCGGGGTGAAATCCTTAGTTTTGGGACGTTTC
CTGAGTCAGATTTCGCAAAAACTGATTACAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTT
GCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAACGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGT
20 GGTGGACGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGT
GGGCGTGGACTAATTTAGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAA
CGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAG
AATCAGAATCCCAATTCTGACGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTCAGCCAGGTACAT
GGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGAACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATACAG
25 GAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAA
GGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACC
TGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAA
CTAAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAA
GTTCCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAAC
30 ATCGCGGAGGCCATAGCCCACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGA
GAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAG
ATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCG
TGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCC
AACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACCAACGACCTTCGAACACCAGCAGC

CGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGG
AAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTG
AGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAG
TGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACG
5 TCAGACGCGGAAGCATCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCA
CGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATT
CAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAA
TCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGTATCAGAAACTGTGCTACATTCATCATATC
ATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGA
10 CTGCATCTTTGAACAATAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGACAAGCTTGTCGAGAAGTACTA
GAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCC
ACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATT
TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGA
15 TCTGATCACTGCTTGAGCCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAAATCTAGTTCCAAACT
ATTTTGTCAATTTTAAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTATTTTG
TCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCCACCCCTCCCAGTTCCCAACTATT
TTGTCCGCCCACAGCGGGGCATTTTTCTTCTGTTATGTTTTTAATCAAACATCCTGCCAA
CTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTT

20 将两个重组载体分别转化至 DH10Bac 感受态细胞 (Invitrogen)，进行蓝白斑筛选，挑
取白色阳性克隆培养，使用 PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen) 提
取杆状病毒质粒 (Bacmid)。将两种 Bacmid 分别转染至贴壁 SF9 细胞 (Gibco)，3 d 后收
获初代重组杆状病毒，并进行扩增至 P2 代。最终得到 P2 代重组杆状病毒分别命名为
BV-Cap-ITR-Rep 和 BV-IE-hr1Cap-ITR-Rep，使用 TCID50 法分别测定病毒滴度。此部分内容
25 具体参照 Bac to Bac Expression System 操作手册 (Invitrogen)。

实施例 2 rAAV2 的包装及滴度测定

将两种 P2 代重组杆状病毒分别以 MOI=0.1 感染 25 mL 悬浮 SF9 细胞 (密度 3.0E+06
cell/mL)，4 d 后收获细胞，使用 5 mL TNT 裂解液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)，150 mM
NaCl，1% Triton X-100，10 mmol/l MgCl₂) 室温孵育 1 h 裂解细胞。以 50 U/mL 终浓度加入
30 核酸酶 37°C 消化 2 h，取样使用蛋白酶 K (天根) 56°C 消化外壳 1 h，qPCR 测定滴度，检测
步骤如下：

定量 PCR 使用的标准品为 Pvu I -HF (NEB) 单酶切线性化的 pAAV-EGFP 质粒，(质粒
序列如以下 SEQ ID NO: 22 所示)。

SEQ ID NO.22:

ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTC
AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC
5 CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCT
TATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
10 AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT
CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
15 AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAAT
GCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTG
ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC
AATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG
CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATT
20 AATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTT
GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAG
CTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
25 GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAT
TGGAACACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC GCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
30 GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTAT
TGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA AATAGGGGTTCCG
CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGT
GAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC

CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGCTG
GCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATAAAATTGTAAACGT
TAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGG
CCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTT
5 GTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGC
GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTT
TTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTAG
AGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAG
GAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACC
10 CGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGT
GAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCCCTGCAGGCAGC
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTT
TGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
ACTAGGGGTTCCCTACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG
15 CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA
TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG
CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
20 TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTT
GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAATAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCG
TCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTAC
25 CGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC
GTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCT
GCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGC
CATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA
30 AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA
GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTAC
AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCA
GAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACC

CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGT
TCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGGTTCGACGTT
TATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATT
TGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA
5 ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGTTTAA
ACAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
CGCAGCTGCCTGCAGG

定量 PCR 使用的引物序列为:

10 ITR Forward primer 5' - GGAACCCCTAGTGATGGAGTT -3' (SEQ ID NO: 2)

ITR Reverse primer 5' - CGGCCTCAGTGAGCGA -3' (SEQ ID NO: 3)

定量 PCR 运行程序为: 95°C 60 s, (95°C 15 s, 60°C 30 s, 40 cycles)。

根据定量 PCR 所得 Ct 值和标准品浓度绘制标准品曲线后, 换算出样品滴度。计算出
BV-Cap-ITR-Rep 和 BV-IE-hr1Cap-ITR-Rep 包装的 rAAV 产量分别为 2.39E+04 VG/cell (相当
15 于 7.18 E+10 VG/mL) 和 8.67 E+05 VG/cell (相当于 2.60 E+12 VG/mL)。

实施例 3 细胞感染过程中 EGFP 的表达和细胞裂解液中 Cap 蛋白表达量比较

在感染 48 h、72 h、96 h 后分别于倒置荧光显微镜下观察被两种杆状病毒感染的细胞,
优化后的重组杆状病毒可大幅度降低目的基因(本实施例中目的基因为 EGFP)的表达(图
5)。目的基因(EGFP)表达量的减少似乎减弱了对细胞内 rAAV 包装的干扰, 使其更有利
20 于 rAAV 包装相关的结构与功能蛋白的表达。

对等量细胞裂解液使用 Cap 蛋白抗体(Progen)进行 WB 检测(图 6)。结果表明优化
后的重组杆状病毒感染细胞后, 细胞内的 Cap 蛋白表达水平显著提高。

实施例 4 纯化后 rAAV2 电镜检测, 感染性测定

使用 POROS™ CaptureSelect™亲和层析填料(Thermo)纯化细胞裂解液, 用荧光定量
25 PCR 方法测定滴度(测定方法同实施例 2), 并对纯化后的 rAAV2 进行负染色处理, 透射式
电子显微镜下观察(图 7)。包装了基因组的 rAAV2 呈实心颗粒, 无核酸的缺陷 rAAV 颗粒
中间被染成深色。总体来看形态完好, 与传统方法(Benskeyetal.2016)相比空壳率显著降低
(~3%), 表明采用优化后的杆状病毒载体构建体明显降低了包装产物中空壳病毒的比例,
显著减少了下游的空壳病毒去除等步骤的压力。

30 将纯化的 rAAV2 梯度稀释, 分别以 MOI=10000、2000、400、80 感染培养的 293T 细胞
(48 孔板, 5.0 E+04 cells/well)。感染 2 天后, 用荧光显微镜观察 EGFP 的表达。实验结果

表明，该系统制备出的 rAAV2 具有较高的体外感染活性（图 8）。

5 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案，并不能理解为对本发明的限制。此外，本文所列出的各种修改以及发明中方法的变化，在不脱离本发明的范围和精神的条件下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述，但应当理解，本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上，各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

权利要求书

- 1、核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体包括以下元件：AAV 元件和编码 IE 蛋白的多核苷酸，所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件。
5
- 2、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸。
- 3、根据权利要求 2 所述的核酸构建体，其特征在于，所述 IE 蛋白由 Acie0、Acie01 或 Acie02 基因中的一种或几种编码，和/或，所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4 或 hr5 中的一种或几种。
10
- 4、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括 IE 蛋白基因的启动子，所述 IE 蛋白基因的启动子选自 Gp64、pH、p6.9 或 p10 中的一种或几种。
- 5、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括杆状病毒启动子，所述杆状病毒启动子与杆状病毒重组同源区连接，所述杆状病毒启动子优选为 pH、Gp64、p6.9 或 p10 中的一种或几种。
15
- 6、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述 AAV 顺式作用元件选自 ITR 序列。
- 7、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体还包括外源目的基因，所述外源目的基因嵌入 AAV 元件中。
- 8、根据权利要求 7 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体的结构为：IE 基因表达框-Cap 基因表达框-ITR-外源目的基因表达框-ITR-Rep 基因表达框。
20
- 9、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1。
- 10、根据权利要求 1 所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体为腺相关病毒载体或重组杆状病毒载体，所述重组杆状病毒载体优选为重组杆状病毒穿梭载体。
25
- 11、一种重组杆状病毒，其特征在于，所述重组杆状病毒为由权利要求 1-10 任一所述的核酸构建体经杆状病毒系统构建获得，或由包括权利要求 1-10 任意所述核酸构建体中任意元件的核酸构建体共同经杆状病毒系统构建获得。
- 12、一种腺相关病毒，其特征在于，所述腺相关病毒为由权利要求 11 所述的重组杆状病毒感染细胞后包装获得。
30

- 13、一种细胞系，其特征在于，所述细胞系为经权利要求 11 所述的重组杆状病毒感染的细胞系。
- 14、一种腺相关病毒载体系统，其特征在于，所述腺相关病毒载体系统包括杆状病毒系统和权利要求 1-10 任一所述的核酸构建体。
- 5 15、一种构建权利要求 1-10 任一所述核酸构建体的方法，其特征在于，所述构建方法包括将携带外源目的基因的 AAV 元件、编码 IE 蛋白的多核苷酸和编码杆状病毒重组同源区的多核苷酸整合入杆状病毒载体骨架中。
- 16、根据权利要求 15 所述的构建方法，其特征在于，所述构建方法包括以下特征中的一项或几项：
- 10 1) 所述 AAV 元件包括编码 Cap 蛋白的多核苷酸、编码 Rep 蛋白的多核苷酸和 AAV 顺式作用元件，所述 AAV 顺式作用元件优选为 ITR 序列；
- 2) 所述编码 IE 蛋白的多核苷酸选自 Acie0、Acie01 或 Acie02 中的一种或几种；
- 3) 所述杆状病毒载体骨架选自 pFastBacdual、pFastBac1、pFastBacHTA、pFastBacHTB 或 pFastBacHTC 中的一种；
- 15 4) 所述杆状病毒重组同源区选自 hr1、hr2、hr3、hr4 或 hr5 中的一种或几种。
- 17、一种腺相关病毒的生产方法，其特征在于，所述生产方法包括以下步骤：将权利要求 11 所述的重组杆状病毒感染昆虫细胞系。