



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109055511 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811090796.9

(22)申请日 2018.09.19

(71)申请人 天津市农业生物技术研究中心

地址 300384 天津市西青区津静公路17公
里处

(72)发明人 金凤媚

(74)专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公
司 12207

代理人 朱红星

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法,包括取番茄植株的叶片,提取总DNA;等位基因特异性扩增、PCR扩增等步骤,最后将所有反应物混匀后,于PCR仪上扩增,PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。该方法可区分出抗感品种且操作简单适合在一般实验室普及。本方法可加快抗病育种进程,对推进蔬菜产业可持续发展具有重要意义。

1. 一种用于检测抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的特异性引物,其特征在于具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4所示序列。

2. 采用权利要求1所述的特异性引物进行抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法,其特征在于按如下的步骤进行:

(1) 方法:取番茄植株的叶片,提取总DNA;

(2) 引物的设计与合成:等位基因特异性扩增

扩增抗病基因的引物对:

415K1F:CCGTAGCTCCATTGTCGTcAg SEQ ID NO:1

31459KR:CCATCTCAGTCCCCACCTT SEQ ID NO:2

扩增感病基因的引物对:

31459GF:CTTGTAATAACTCTCTct SEQ ID NO:3

31459CGR:GCCGGATCGACATAGCAATC SEQ ID NO:4

(3) PCR扩增:反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 50 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs (each 10mmol/L),0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物10 μ mol/L,2.5 μ L,3'端引物10 μ mol/L,2.5 μ L;PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增,

循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min,抗病引物退火温度均为63 $^{\circ}$ C,感病引物退火温度均为60 $^{\circ}$ C;于PCR仪上扩增,PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

3. 权利要求2所述的抗番茄斑萎病毒基因SW-5b检测方法在快速区分番茄对TSWV的抗性方面的应用。

一种抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物保护领域,涉及提供一种快速、简捷、经济的抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法。

背景技术

[0002] 近年来番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus,TSWV)成为继TY之后的又一危害重大的病害。番茄斑萎病毒发生时首先在上部叶片和果实上出现褐色病斑和病斑轮纹,一部份果实还会呈肿瘤状畸形果,尤其是幼果的病害症状比较严重,极易落果。该病最早于1915年在澳大利亚发现(Brittlebank,1919),已在巴西、法国、西班牙、美国等多个番茄产区造成了严重的损失(Soler,et al.,2003)。番茄斑萎病毒属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)番茄斑萎病毒属(Tospovirus),寄主植物非常广泛,可侵染84个科1090种植物。该病毒以蓟马为媒介传播,可在蓟马体内自行复制增殖。其中西花蓟马传播效率最高。中国于2003年检测出西花蓟马(张友军等,2003),之后随着西花蓟马危害范围逐年扩大,番茄斑萎病毒在四川、云南、广州等地多种园艺植物上发现(丁铭等,2004,)。在调研中,我们在北京顺义、天津西青、河北廊坊等地均发现了该病害,严重的棚室80%绝收。更值得注意的是,2016未发现该病的番茄产区,2017均有发生,所以该病害有大流行的趋势,而种植者缺乏对此病害的认识与准备,该病害一旦发生,扩散迅速!

番茄斑萎病毒的抗性基因的分离鉴定工作,经过科学家多年的研究也取得了一些成果。在栽培番茄和野生番茄中均发现了抗TSWV的遗传资源,但抗性水平不相一致。Finlay(1953)在不同栽培番茄中鉴定出了Swa1、Swb1、sw2、sw3、sw4等抗性基因。但因这些基因对TSWV具有小种特异性,抗性很快被克服。直到1992年Stevens从秘鲁番茄中鉴定出显性抗性的SW-5b基因,该基因对TSWV不同小种具有很高的广谱抗性。含有SW-5的番茄可以限制病毒在体内的广泛传播,仅表现为轻微的过敏性反应。所以很多育种工作者将该基因作为重点研究对象,并取得了一些成果,培育出了含有SW-5b基因的樱桃番茄和加工番茄(邱树亮等),这为培育抗TSWV的鲜食番茄提供了经验和理论基础。

[0003] 针对这一基因Shi等人已开发出一个基因特异性PCR标记,但此标记仅能扩增出抗病基因,对感病基因却无能为力;Lee等人(2015)开发出一个基于高分辨率熔解曲线(HRM)的分子标记方法,但该方法需要用到昂贵的仪器,不能在普通实验室普及。Dianese等人(2010)建立了一种INDEL标记方法来检测SW-5b基因,该方法是通过PCR技术对TSWV的抗病基因和感病基因进行检测,但此方法扩增的产物大小相差太小在普通的凝胶电泳区分不明显,经常出现误判的现象。

[0004] 本研究就是在Shi(2011)等人研究的基础上,利用等位基因特异性PCR方法开发出一种费用低廉的PCR方法检测SW-5b。该方法可区分出抗感品种且操作简单,结果容易判断,适合在一般实验室普及。本方法可加快抗病育种进程,对推进蔬菜产业可持续发展具有重要意义。

发明内容

[0005] 为实现上述目的,本发明公开了如下的技术内容:

一种用于检测抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的特异性引物,其特征在于具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4所示序列。

[0006] 本发明进一步公开采用该特异性引物进行抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法,其特征在于按如下的步骤进行:

(1)方法:取番茄植株的叶片,提取总DNA;

(2)引物的设计与合成:等位基因特异性扩增
扩增抗病基因的引物对:

415K1F:CCGTAGCTCCATTGTCGTcAg SEQ ID NO:1

31459KR:CCATCTCAGTCCCCACCTT SEQ ID NO:2

扩增感病基因的引物对:

31459GF:CTTGTAATAACTCTCTct SEQ ID NO:3

31459CGR GCCGGATCGACATAGCAATC SEQ ID NO:4

(3)PCR扩增:反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 50 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs (each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物(10 μ mol/L)2.5 μ L,3'端引物(10 μ mol/L)2.5 μ L;PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增,

循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min,抗病引物退火温度均为63 $^{\circ}$ C,感病引物退火温度均为60 $^{\circ}$ C;于PCR仪上扩增,PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0007] 本发明更进一步公开了抗番茄斑萎病毒基因SW-5b检测方法在快速区分番茄对TSWV的抗性方面的应用。实验结果显示准确可靠与测序结果一致。该方法可区分出抗感基因型,结果容易判断,操作简单适合在一般实验室普及。

[0008] 本发明主要解决了番茄斑萎病毒抗性基因检测费时费力且结果判断不准确的问题,重点考察了PCR扩增时的引物和退火温度对检测结果的影响,主要的难点在于不同类型的错配碱基对扩增的影响,为此先后考察了A-C、T-C、C-C、A-A、G-G等错配类型和引入一个错配和两个错配对PCR的影响还有不同退火温度等条件,最后确定的方案是引入A-C错配可扩增出抗病基因型,感病基因型不能扩增,引入其它类型错配的碱基不能有效区分抗感基因型,即扩增抗病基因的引物为:415K1F:CCGTAGCTCCATTGTCGTcAg和31459KR:CCATCTCAGTCCCCACCTT,退火温度为63 $^{\circ}$ C。扩增感病基因的引物为不引入错配碱基的引物即:31459GF:CTTGTAATAACTCTCTct和31459CGR:GCCGGATCGACATAGCAATC,退火温度为60 $^{\circ}$ C。

[0009] PCR扩增反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 20~60 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs (each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物(10 μ mol/L)2.5 μ L,3'端引物(10 μ mol/L)2.5 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增。循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min。于PCR仪上扩增(MJ PTC-200)。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0010] 本发明更加详细的描述如下:

1. 材料和方法

1.1 材料

抗病纯合:LA3667

感病纯合:cy299-6

杂合型:LA3667 × cy299-6获得的F1代。

[0011] 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

参考毛国杰等(2001)的方法。

[0012] 1.2.2 抗感品种Sw-5基因部分片段克隆

根据Shi(2011)等人设计的Sw5b-f1/r1引物扩增抗病基因型材料和感病基因型材料。将获得的片段进行克隆和测序。利用Sw5b-f1/r1引物(Sw5b-f1: AACCCTAGGGGCGATCCTT; Sw5b-r1 CTCCTATGTGGCTGCTCCA),对抗病品种和感病品种进行PCR扩增,反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 20~60 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs(each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,3'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增。循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min。将所有反应物混匀后,于PCR仪上扩增(MJ PTC-200)。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。采用奥莱博有限公司的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收PCR产物,将其进行连接、转化后,挑取阳性克隆。在Takara公司进行测序。

[0013] 1.2.3 抗性基因特异性引物的设计

根据测序结果设计等位基因特异性的引物。为了在不同材料中检测目标SNP,采用等位基因特异性PCR方法(allele-specific PCR,AS-PCR)。其引物设计原理为:以等位基因SNP为约束条件,设计特异的上游引物,将SNP置于引物的3'端的不同位置并在特异性引物的3'端引入1个或2个错配碱基,以增强等位基因特异性PCR的扩增效果。以产物长度便于电泳和紫外分析为约束条件,利用primer3再设计一个公用下游引物(表1)。设计引物时尽可能减少发夹结构,引物二聚体和交叉二聚体等。特异性引物的3'端分别与抗病品种和感病品种的SNP位点相匹配。与特异性引物相匹配的等位片段有扩增产物,不匹配的没有扩增产物。

[0014] 反应体系

反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 20~60 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs(each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,3'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增。循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min。退火温度视引物而定。将所有反应物混匀后,于PCR仪上扩增(MJ PTC-200)。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0015] 产物分析方法

制备1.5%琼脂糖凝胶,取PCR产物5 μ L与1 μ L loading dye 混合后上样,在电压为80 V条件下电泳 30 min,电泳结束后,凝胶置于0.5 μ g/L溴化乙锭中染色20 min,将已染色凝胶置于成像系统中观察并照像。

[0016] 结果和分析

2.1 材料的测序验证

将含有抗病基因的品种LA3667 和含有感病基因的品种cy299-6进行克隆,经PCR检测

为阳性的克隆送到上海生工公司测序。测序结果发现抗病品种在三处有SNP，327和329及371处(如图1)。通过美国国家生物信息中心NCBI的GeneBank对比，证明克隆获得的片段为番茄Sw-5基因及基等位基因(GenBank: AY007366)。

[0017] 依测序结果设计引物

选定包括327和329等位基因突变位点在内的核苷酸序列片段作为该检测抗病基因的扩增区。选定包括371等位基因突变位点在内的核苷酸序列片段作为感病基因的扩增区(如图1所示)。为了在不同材料中检测目标SNP，采用等位基因特异性PCR方法(allele-specific PCR, AS-PCR)。在引物设计过程中，还在上游引物的3'端引入1个或2个错配碱基，以增强等位基因特异PCR的扩增效果(表1)

表1 依测序结果设计的引物

序号	名称	序列	错配说明	产物长度 (bp)
1	415K1FCCGTAGCTCCATTGTCGTcGg		无错配	
2	415K1FCCGTAGCTCCATTGTCGTcGg		C-C 错配	
3	415K1FCCGTAGCTCCATTGTCGTcAg		A-C 错配	
4	415K2FCCGTAGCTCCATTGTCGTcTg		T-C 错配	
5	415K3FCCGTAGCTCCATTGTCCTcGg		引入两个错配，即 引物2的基础上隔一个碱基， 再引入一个错配C-C	
6	415K4FCCGTAGCTCCATTGTCGAcTg 扩增感病基因型引物		引物2的基础上再引入紧邻错配， A-A 错配	
7	31459GF: CTTGTAATAACTCTCTct		无错配	
8	31459CGF CTTGTAATAACTCTCTct 下游引物		由C变G, G-G 错配	
9	31459KR: CCATCTCAGTTCACCCCTT			720
10	31459CGR GCCGGATCGACATAGCAATC			250

注：小写字母为突变碱基，斜体字母为引入错配碱基。

[0018] 2.4 不同引物在抗病品种中的扩增结果

引物1是以抗病品种的原序列为引物，将两个SNP碱基置于引物的3'端。结果表明，退火温度在55℃-63℃的范围内，抗病品种和感病品种中均扩增了相应大小的条带。证明该引物不能有效阻止基因与引物的错配，从而不能有效区分抗感品种(图2中的泳道1、2、3)。鉴于此，引物2、3和4在设计时将两个SNP之间的位点引入错配碱基。发现不同的错配类型对PCR的结果有影响。引物2和4分别由G换成c，形成C-C错配和由G换成T，形成T-C错配，在扩增出均可扩增出条带，不能区分出抗感基因型(图2中的泳道4-9)。引物5和6引入了两个错配碱基，引物5即在原来C-C错配的基础上隔一个碱基，再引入一个错配C-C；引物6在原来C-C错配的基础上紧邻错配，形成A-A错配。在进行PCR扩增时即使温度在50℃-55℃时均不能扩增出条带。

[0019] 引物3由G换成A，形成A-C错配。在退火温度为60℃-62℃时抗病基因型和感病基因型均能扩增出条带，只是感病基因的条带逐渐变浅，直到63℃时只扩增出抗病基因型，而感

病基因型未得到扩增如图3。经反应实验确定在63℃时可扩增出抗病基因的目的条带,而且可有效识别抗感基因型如图4,其中泳道1为抗病品种,泳道2为感病品种,泳道3为杂合型。在抗病品种和杂合型品种中,因含有抗性基因的碱基,目的条带被扩增出来,而在感病品种中无扩增,这样就区分出了品种的抗感性。

[0020] 2.5 感病品种不同引物的扩增结果

感病品种的特异性引物的设计中,引物7为未引入任何错配碱基的原始引物,引物8将SNP邻近位点引入错配碱基,由C变G,形成G-G错配;在扩增时退火温度提高到60℃时,引物7扩增出了感病型和杂合型,而抗病基因型未得到扩增。引物8在扩增时,退火温度在50℃-65℃的范围内均未得到扩增。经反复试验,引物7在60℃时均能有效地区分出抗病基因型与感病基因型和杂合型。

[0021] 本发明与其它的SW-5b分子标记检测方法不同,该方法只需要PCR就能区分出番茄对ToMV的抗感性,不需要酶切或其它贵重仪器,且结果容易判断,具有简单快捷的特点。

[0022] 2.6 准确性的验证

利用检测抗病基因引物和检测感病基因引物对未知抗性的样品津杂213、L-402、赛娜、齐达利、SBD进行扩增,结果如图6和7。利用抗病基因引物进行检测,SBD扩增出了目的条带,而津杂213、L-402、赛娜、齐达利未得到扩增;利用感病基因引物进行检测,津杂213、L-402、赛娜、齐达利均扩增出了目的基因,SBD未得到扩增

利用Sw5b-f1/r1引物对津杂213、L-402、赛娜、齐达利、SBD进行PCR扩增,然后测序验证。结果SBD在327、329和371处分别为C、G和C;津杂213、L-402、赛娜、齐达利在327、329和371处分别为T、A和T(如图8)。证明415K1F/31459KR引物对和31459GF/31459CGR引物对能有效地区分出抗感基因型与测序结果一致。

附图说明

[0023] 图1.包含SNP在内的核苷酸序列片段;其中上面序列为抗病基因型,下面序列为感病基因);

图2.引物1、2、4的扩增结果;其中1、4、7为LA3667;2、5、8为cy299-6;3、6、9为3110(F1);M.DL2000;注:1-3为引物1扩增结果;4-6为引物2扩增结果;7-9为引物4扩增结果;

图3.不同退火温度下引物3的PCR结果;1-3. Tm 60℃;4-6. Tm 61℃;7-9. Tm 62℃;10-12. Tm 63℃;M.DL2000;1、4、7、10为LA3667;2、5、8、11为3110(F1);3、6、9、12为cy299-6;

图4 引物3的扩增结果;1. LA3667;2. cy299-6;3. 3110(F1)M. DL2000;

图5.引物7和8检测感病基因的PCR扩增;1. cy299-6;2. 3110(F1);3. LA3667;4. cy299-6;5. 3110(F1);6. LA3667;M. DL2000;1-3为引物7扩增结果;4-6为引物8扩增结果;

图6.415K1F/31459KR扩增结果;其中M. DL2000;1.津杂213;2.L-402;3.赛娜;4.齐达利;5.SBD;

图7.31459GF/31459CGR扩增结果;其中M. DL2000;1.津杂213;2.L-402;3.赛娜;4.齐达利;5.SBD;

图8.津杂213、L-402、赛娜、齐达利、SBD测序结果;注:斜体为突变碱基;

图9.引物415K1F/31459KR扩增结果;1.ZF5;2.LA3667;M. DL2000;

图10. 引物31459GF/31459CGR扩增结果;其中1.LA3667;2. ZF5;M. DL2000。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。本发明所用原料及试剂均有市售。

[0025] 实施例1

一种采用特异性引物进行抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法,其特征在于按如下的步骤进行:

(1)方法:取番茄植株的叶片,提取总DNA;

(2)等位基因特异性扩增

扩增抗病基因的引物对:

415K1F:CCGTAGCTCCATTGTCGTcAg SEQ ID NO:1

31459KR:CCATCTCAGTCCCCACCTT SEQ ID NO:2

扩增感病基因的引物对:

31459GF:CTTGTAATAACTCTCTct SEQ ID NO:3

31459CGR GCCGGATCGACATAGCAATC SEQ ID NO:4

(3)PCR扩增:反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 50 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs (each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5,端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,3,端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L;PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增,循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min,抗病引物退火温度均为63 $^{\circ}$ C,感病引物退火温度均为60 $^{\circ}$ C;将所有反应物混匀后,于PCR仪上扩增(MJ PTC-200),PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0026] 实施例2

实际应用:

1.材料:2015年春以LA3667为父本,浙粉202(市售)自交5代后的品系ZF5。

[0027] 2.方法

2.1育苗

将F2代番茄种子播于育苗盘中每穴2粒,常规管理,待到5片叶时进行检测。

[0028] 2.2 DNA提取。采用CTAB法进行DNA提取。

[0029] 2.3等位基因特异性扩增

扩增抗病基因的引物对:

415K1F:CCGTAGCTCCATTGTCGTcAg

31459KR:CCATCTCAGTCCCCACCTT

扩增感病基因的引物对:

31459GF:CTTGTAATAACTCTCTct

31459CGR GCCGGATCGACATAGCAATC

反应总体积为25 μ L,包括模板DNA 50 ng,Taq DNA聚合酶 0.5 U,dNTPs(each 10mmol/L) 0.5 μ L,10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,5'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,3'端引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C热启动之后,进行PCR扩增。

[0030] 循环条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环35次,72 $^{\circ}$ C过度延伸10 min。抗病引物退火温度均为63 $^{\circ}$ C,感病引物退火温度均为60 $^{\circ}$ C。将所有反应物混匀后,于PCR仪上扩增(MJ PTC-200)。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0031] 2.4 结果

利用引物3即415K1F/31459KR这对引物,抗病品种LA3667能扩出720bp的条带,感病品种浙粉202后代纯系ZF5无扩增;利用引物7即31459GF/31459CGR这对引物感病品种浙粉202后代纯系ZF5能扩出250bp的条带,抗病品种LA3667无扩增。证明该方法能有效区分出番茄对TSWV的抗感性。

SEQUENCE LISTING

<110> 天津市农业生物技术研究中心

<120> 一种抗番茄斑萎病毒基因SW-5b的检测方法

<130> 1

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ccgtagctcc attgtcgtca g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ccatctcagt tccccacctt 20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cttgtaataa ctctctct 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gccggatcga catagcaate 20

```
Query_241 ATCATCCAATACAATGAGATATCTCTTTCCCATTAATTTTCCTCAACATGTCGGGAAC 300
|||||
Subject_241 ATCATCCAATACAATGAGATATCTCTTTCCCATTAATTTTCCTCAACATGTCGGGAAG 300
327 329

Query_301 AACGTCAACCGTAGCTCCATTGTCGTGGAACTGTAACTTGACTAAAAATATCTTGTAA 360
|||||
Subject_301 AACGTCAACCGTAGCTCCATTGTCGTGGAACTGTAACTTGACTAAAAATATCTTGTAA 360
372

Query_361 TAACTCTCTCGATTATACGTTTGAGAAATGATGCACCATGCTCGAACATCAAAGCGAGA 420
|||||
Subject_361 TAACTCTCTCGATTATACGTTTGAGAAATGATGCACCATGCTCGAACATCAAAGCGAGA 420
```

图1

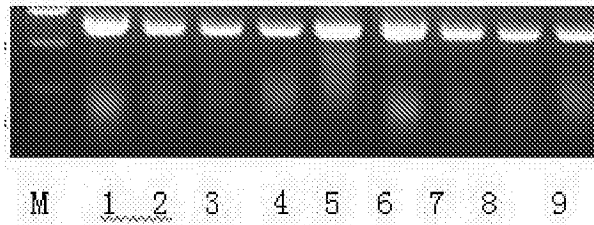


图2

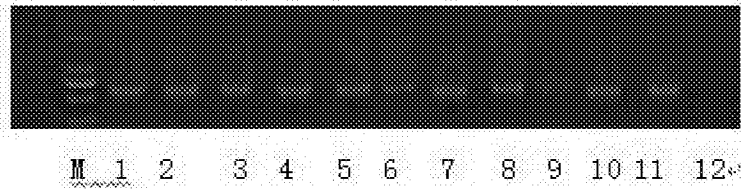


图3

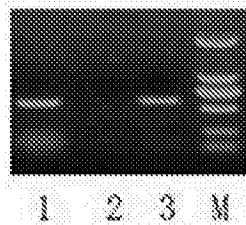


图4

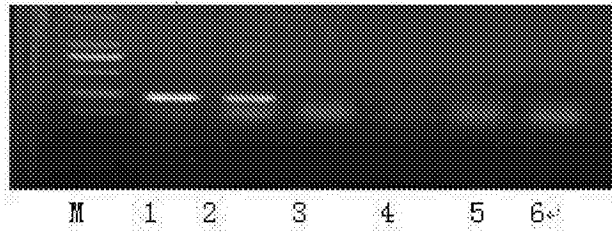


图5

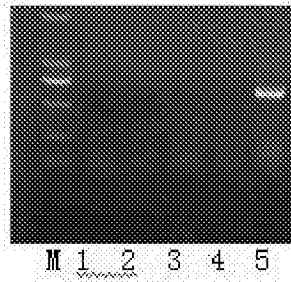


图6

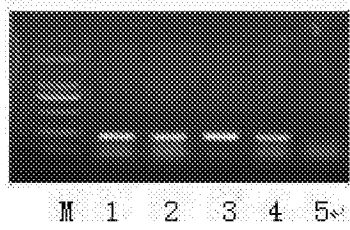


图7

SEQ : 327_329-
 361 AACCTCAACCTTAGCTCATTTGCGTCAAACTGTAACTTAACTAAAATATCTTTTAA 360-
 371-
 381 TAACTCTCTCAGATTATACCTTTGCAAAATGATGACCACTCTCAACTCAAACTGACA 420-
 213 : ✓ 327_329-
 361 AACCTCAACCTTAGCTCATTTGCGTCAAACTGTAACTTAACTAAAATATCTTTTAA 360-
 371-
 381 TAACTCTCTCAGATTATACCTTTGCAAAATGATGACCACTCTCAACTCAAACTGACA 420-
 1402 : ✓ 327_329-
 361 AACCTCAACCTTAGCTCATTTGCGTCAAACTGTAACTTAACTAAAATATCTTTTAA 360-
 371-
 381 TAACTCTCTCAGATTATACCTTTGCAAAATGATGACCACTCTCAACTCAAACTGACA 420-
 213 : ✓ 327_329-
 361 AACCTCAACCTTAGCTCATTTGCGTCAAACTGTAACTTAACTAAAATATCTTTTAA 360-
 371-
 381 TAACTCTCTCAGATTATACCTTTGCAAAATGATGACCACTCTCAACTCAAACTGACA 420-
 开达利 ✓ 327_329-
 361 AACCTCAACCTTAGCTCATTTGCGTCAAACTGTAACTTAACTAAAATATCTTTTAA 360-
 371-
 381 TAACTCTCTCAGATTATACCTTTGCAAAATGATGACCACTCTCAACTCAAACTGACA 420-

图8

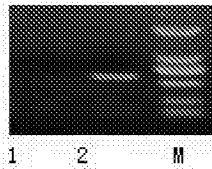


图9

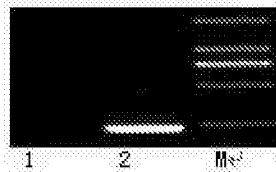


图10