



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113136372 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202110591986.4

(22) 申请日 2021.05.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113136372 A

(43) 申请公布日 2021.07.20

(73) 专利权人 广西大学
地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路100号

(72) 发明人 郑德洪 彭仕文 袁高庆

(74) 专利代理机构 北京众达德权知识产权代理有限公司 11570
专利代理师 张晓冬

(51) Int. Cl.
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 102464717 A, 2012.05.23
- CN 102770555 A, 2012.11.07
- CN 109336979 A, 2019.02.15
- EP 0972841 A1, 2000.01.19
- WO 2018157454 A1, 2018.09.07
- Larisa Smelyanski等.Site directed biotinylation of filamentous phage structural proteins.Virol J.2011, (第8期), 全文.
- Cho H等.Ralstonia solanacearum strain SL2729 plasmid unnamed, complete sequence.Genbank Database.2018, Accession No.CP022793.1.

审查员 倪志远

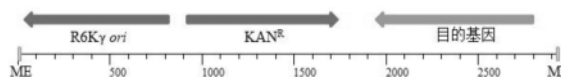
权利要求书1页 说明书11页
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

一种重组噬菌体的构建方法

(57) 摘要

本发明涉及分子生物技术领域,具体涉及一种重组噬菌体的构建方法。一种重组噬菌体的构建方法,包括以下步骤(1)提取丝状噬菌体复制型DNA;(2)制备带有目的基因的Tn5转座子DNA;(3)体外插入转座子DNA;(4)转化大肠杆菌DH5 α λ pir;(5)制备混合质粒文库;(6)转化宿主细胞;(7)筛选重组噬菌体;(8)检测目的基因的表达。本发明的构建方法操作简单,在不依赖目标丝状噬菌体功能基因组研究的情况下就可以构建重组丝状噬菌体,对研究目标重组丝状噬菌体的应用具有重要意义。



1.一种青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)重组噬菌体的构建方法,其特征在于,包括以下步骤

(1)提取丝状噬菌体复制型DNA;

(2)制备带有目的基因的Tn5转座子DNA;

(3)体外插入转座子DNA:取等摩尔量的丝状噬菌体复制型DNA和转座子DNA,在Tn5转座酶的作用下,37°C孵育2h;

(4)转化大肠杆菌DH5 α λ pir:采用热激法,利用步骤(3)获得的反应物转化经氯化钙处理制备的大肠杆菌DH5 α λ pir感受态细胞;

(5)制备混合质粒文库:收集步骤(4)的大肠杆菌转化子,加入液体培养基,混匀,利用SDS碱裂法提取混合菌液中的质粒;

(6)转化宿主细胞:采用电激法,利用步骤(5)提取的混合质粒文库转化丝状噬菌体的宿主细菌,经筛选,获得转化子;

(7)筛选重组噬菌体:随机挑取多个经步骤(6)的转化子,接种于液体培养基中,震荡培养,离心,滤过上清液;将滤液与丝状噬菌体的指示细菌混合培养,于不同时间点检测指示细菌的抗性来判断重组噬菌体的活性;

(8)检测目的基因的表达:将具有活性的重组噬菌体感染宿主细菌,提取感染后细菌的总蛋白,使用外源目的基因所编码蛋白的抗体,通过蛋白免疫印迹检测目的基因的表达情况;

其中,步骤(1)中丝状噬菌体为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)的丝状噬菌体RSCq,其复制型双链环状DNA共计7480bp,序列见SEQ ID No.1;

步骤(2)中Tn5转座子DNA两侧为Tn5转座酶的识别序列,且内部包含丝状噬菌体复制型DNA在大肠杆菌中复制所需的复制起始位点ori、用于筛选卡那霉素抗性的Kan^R基因、以及带启动子和翻译元件的目的基因;

步骤(2)中目的基因为通过商业化基因合成服务合成的由lac启动子控制的降解青枯雷尔氏菌群体感应信号分子的酯酶elp104 DNA,序列见SEQ ID No.2;

步骤(3)的反应体系为:RSCq复制型DNA 5 μ L、转座子DNA 3 μ L、EZ-Tn5 10X 反应缓冲液 1 μ L、EZ-Tn5 转座酶 1 μ L,总计10 μ L。

一种重组噬菌体的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物技术领域,具体涉及一种重组噬菌体的构建方法。

背景技术

[0002] 噬菌体,是专一性感染细菌、古菌和藻类等微生物的病毒。对噬菌体进行遗传改造,可以获得重组噬菌体;通过遗传改造可以强化、改变或赋予噬菌体某方面特性,在抗细菌感染、病原物检测和植物细菌病害生物防治等多方面都具有重要应用价值。如类T7噬菌体尾部基因的替换,改变了其宿主范围;又如在噬菌体基因组中插入荧光蛋白编码基因或荧光素酶基因,所获得的重组噬菌体可用于病原细菌的快速检测。目前,有尾噬菌体的遗传改造方法包括宿主细菌内同源重组和噬菌体基因组片段体外组装,但这两种方法操作相对复杂,技术门槛高。

[0003] 丝状噬菌体是一类呈丝状结构的噬菌体,其基因组一般小于10Kbs,如大肠杆菌的M13噬菌体。虽然丝状噬菌体基因组为单链DNA,但其复制循环过程中会出现双链环状形状的DNA,即复制型DNA。提取丝状噬菌体的复制型DNA后,可在体外进行酶切和连接等分子操作,插入外源目的基因,随后转化宿主细菌,即可获得重组噬菌体。但该构建该方法的前提是:目标丝状噬菌体的基因组功能清晰,即要求目标丝状噬菌体为模式噬菌体;而非模式丝状噬菌体由于尚缺失功能基因组研究,基因功能还不清晰,不能够通过上述方法构建重组噬菌体。

[0004] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种重组噬菌体的构建方法,以解决非模式丝状噬菌体由于尚缺失功能基因组研究,基因功能还不清晰,不能够通过现有方法构建重组噬菌体的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0007] 一种重组噬菌体的构建方法,包括以下步骤

[0008] (1)提取丝状噬菌体复制型DNA;

[0009] (2)制备带有目的基因的Tn5转座子DNA;

[0010] (3)体外插入转座子DNA:取等摩尔量的丝状噬菌体复制型DNA和转座子DNA,在Tn5转座酶的作用下,37℃孵育2h;

[0011] (4)转化大肠杆菌DH5 α pir:采用热激法,利用步骤(3)获得的反应物转化经氯化钙处理制备的大肠杆菌DH5 α pir感受态细胞;

[0012] (5)制备混合质粒文库:收集步骤(4)的大肠杆菌转化子,加入液体培养基,混匀,利用SDS碱裂法提取混合菌液中的质粒;

[0013] (6)转化宿主细胞:采用电激法,利用步骤(5)提取的混合质粒文库转化丝状噬菌

体的宿主细菌,经筛选,获得转化子;

[0014] (7)筛选重组噬菌体:随机挑取多个经步骤(6)的转化子,接种于液体培养基中,震荡培养,离心,滤过上清液;将滤液与丝状噬菌体的指示细菌混合培养,于不同时间点检测指示细菌的抗性来判断重组噬菌体的活性;

[0015] (8)检测目的基因的表达:将具有活性的重组噬菌体感染宿主细菌,提取感染后细菌的总蛋白,使用外源目的基因所编码蛋白的抗体,通过蛋白免疫印迹检测目的基因的表达情况。

[0016] 作为优选,步骤(1)中丝状噬菌体为青枯雷尔氏菌的丝状噬菌体RSCq,其复制型双链环状DNA共计7480bp,序列见SEQ ID No.1。

[0017] 作为优先,步骤(2)中Tn5转座子DNA两侧为Tn5转座酶的识别序列,且内部包含丝状噬菌体复制型DNA在大肠杆菌中复制所需的复制起始位点ori、用于筛选卡那霉素抗性的Kan^R基因、以及带启动子和翻译元件的目的基因。

[0018] 作为优先,步骤(2)中目的基因为通过商业化基因合成服务合成的由lac启动子控制的降解青枯雷尔氏菌群体感应信号分子的酯酶e1p104 DNA,序列见SEQ ID No.2。

[0019] 作为优先,步骤(3)的反应体系为:RSCq复制型DNA 5 μ L、转座子DNA 3 μ L、EZ-Tn5 10X反应缓冲液1 μ L、EZ-Tn5转座酶1 μ L,总计10 μ L。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0021] 本发明的重组噬菌体的构建方法操作简单,在不依赖目标丝状噬菌体功能基因组研究的情况下就可以构建重组丝状噬菌体,对研究目标重组丝状噬菌体的应用具有重要意义。

附图说明

[0022] 图1为转座子DNA的结构图;

[0023] 图2为重组噬菌体的构建流程图;

[0024] 图3为不同时间点检测青枯雷尔氏菌的卡那霉素抗性;

[0025] 图4为重组噬菌体中目的基因的表达检测结果;

[0026] 图5为重组噬菌体感染菌株的酶活检测结果;

具体实施方式

[0027] 下面结合对本发明专利的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域所属的技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范畴。

[0028] 实施例

[0029] 一种重组噬菌体的构建方法,包括如下步骤:

[0030] (1)提取丝状噬菌体复制型DNA,丝状噬菌体为青枯雷尔氏菌的丝状噬菌体RSCq,该丝状噬菌体尚未报道和研究,其基因组为单链DNA,复制型双链环状DNA共计7480bp,序列见SEQ ID No.1;

[0031] (2)制备带有目的基因的Tn5转座子DNA:目的基因为通过商业化基因合成服务合

成的由lac启动子控制的降解青枯雷尔氏菌群体感应信号分子的酯酶elp104 DNA,序列见SEQ ID No.2;

[0032] 转座子DNA的结构图见图1;Tn5转座子DNA两侧为Tn5转座酶的识别序列,且内部包含丝状噬菌体复制型DNA在大肠杆菌中复制所需的复制起始位点ori、用于筛选卡那霉素抗性的Kan^R基因、以及带启动子和翻译元件的目的基因;

[0033] 制备的具体方法为:以R6Kf和R6Kr为引物,以EZ-Tn5<R6K γ ori/KAN-2>为模板,扩增获得R6K;其中,EZ-Tn5<R6K γ ori/KAN-2>购于lucigen公司;

[0034] 以elp104f和elp104r为引物,以elp104 DNA为模板,扩增获得elp104M;

[0035] 以R6Kf和elp104r为引物,以R6K和elp104M模板,扩增获得带有目的基因elp104的转座子DNA,通过DNA胶回收试剂盒,纯化扩增所获得的的转座子DNA;扩增所用引物的序列见下表1。

[0036] 表1扩增引物序列

引物名称	基因序列	序列表序号
R6Kf	5'-CTGTCTCTTATACACATCTCAACCATCATCG-3'	SEQ ID No.3
[0037] R6Kr	5'-TCACTGATCTAGA-CCGCCACGGTTGATGAGAGCT-3'	SEQ ID No.4
elp104f	5'-GTGGCGGTCTAGA-TCAGTGATGATGATGATGATG-3'	SEQ ID No.5
elp104r	5'-CTGTCTCTTATACACATCTCGCGCAACGCAATTAATGTGAG-3'	SEQ ID No.6

[0038] (3) 体外插入转座子DNA:配制下表2的反应体系

[0039] 表2反应体系

试剂	加入量
RSCq 复制型 DNA	5μL
[0040] 转座子 DNA	3μL
EZ-Tn5 10X 反应缓冲液	1μL
EZ-Tn5 转座酶	1μL
反应体系总体积	10μL

[0041] 将反应体系置于37℃水浴锅中孵育2h,随后加入1μL EZ-Tn5 10X反应终止液,70℃水浴锅加热10min,终止反应;其中EZ-Tn5 10X反应缓冲液、EZ-Tn5 10X反应终止液和EZ-Tn5转座酶购于lucigen公司;

[0042] (4) 转化大肠杆菌DH5αpir:将步骤(3)反应物全部加入100μL由氯化钙处理制备的大肠杆菌DH5αpir感受态细胞中,冰浴加热30min,42℃热激90s,冰浴5min,加入800μL LB液体培养基,37℃恢复培养1h,涂布至9个含有卡那霉素的LB固体培养基表面,37℃过夜培养;

[0043] (5) 制备混合质粒文库:用细胞刮铲收集步骤(4)的大肠杆菌DH5αpir转化子,加入适量的LB液体培养基,混匀,获得混合菌液,采用SDS碱裂法提取混合菌液中的质粒;

[0044] (6) 转化宿主细胞:取步骤(5)提取的质粒100ng,加入100μL青枯雷尔氏菌GMI1000菌株的电转化感受态细胞,冰浴10min后加入经预冷的1mm电激杯中,1.8KV电压电激处理,

利用800 μ L BG液体培养基将电激后的青枯雷尔氏菌吸出至无菌的1.5mL离心管中,28 $^{\circ}$ C恢复培养3h,随后涂布至4个含有卡那霉素的BG固体培养基表面,28 $^{\circ}$ C培养48h;

[0045] BG培养基配方为:10g/L蛋白胨,1g/L酸水解络蛋白,1g/L酵母提取物,5g/L葡萄糖,pH 7.0;

[0046] (7) 筛选重组噬菌体:随机挑取步骤(6)获得的青枯雷尔氏菌转化子10个,分别接种至1mL BG液体培养基,并编号区分,28 $^{\circ}$ C震荡培养24h,12000转/min离心3min,取上清用0.22 μ m过滤器过滤;将滤液按1%比例加入接种有指示青枯雷尔氏菌GMI1000的BG培养基中,置于28 $^{\circ}$ C中震荡培养,于0h、2h、5h和8h时间点检测青枯雷尔氏菌的卡那霉素抗性,结果见图3;

[0047] 从图3可以看出,青枯雷尔氏菌GMI1000与1#和3#转化子培养的上清共培后获得了对卡那霉素的抗性,说明1#和3#转化子可以分泌产生具有感染活性的重组噬菌体,分别命名为RSCqelp104-1和RSCqelp104-3;

[0048] (8) 检测目的基因的表达:由于在合成酯酶elp104基因时,在3'端添加有6His标签的编码序列(该部分可以从序列表中看出),所以通过6His标签抗体检测酯酶elp104基因表达,具体为:分别用RSCqelp104-1和RSCqelp104-3感染青枯雷尔氏菌GMI1000,提取被RSCqelp104-1和RSCqelp104-3感染的青枯雷尔氏菌GMI1000细菌总蛋白,以无感染的青枯雷尔氏菌GMI1000为对照,SDS聚苯稀酰胺凝胶电泳分离总蛋白,转膜后进行蛋白质免疫印迹,使用6His标签的单克隆抗体作为一抗进行免疫印迹,结果见图4;

[0049] 从图4中可以看出,RSCqelp104-1和RSCqelp104-3感染的青枯雷尔氏菌GMI1000中都有表达含有6His标签的蛋白,且蛋白大小与elp104酯酶相符,说明酯酶elp104基因可通过重组噬菌体在宿主细菌中表达。

[0050] 另外,重组噬菌体中表达的目的基因为可降解青枯雷尔氏菌群体感应系统的酯酶,所以本实施例检测了RSCqelp104-1和RSCqelp104-3对青枯雷尔氏菌群体感应系统的降解作用,具体为:以群体感应系统下游的多糖合成基因epsA为指示基因,将epsA基因启动子克隆至 β 半乳糖苷酶基因lacZ编码区前,以指示青枯雷尔氏菌的群体感应强度来检测lacZ酶活,结果见图5;

[0051] 从图5中可以看出,相比于无噬菌体感染的群体感应报告菌株,以及原始噬菌体RSCq感染的报告菌株,重组噬菌体RSCqelp104-1和RSCq104-3的感染降低了报告菌株的lacZ酶活。说明elp104基因可以通过重组噬菌体,降解青枯雷尔氏菌的群体感应系统,在对青枯雷尔氏菌所引起的植物青枯病的生物防治中具有重要价值。

[0052] 综上,可以看出本发明不依赖目标丝状噬菌体的功能基因研究情况就可以构建重组丝状噬菌体。

[0053] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 广西大学
 <120> 一种重组噬菌体的构建方法
 <130> 2021
 <160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 7480
 <212> DNA
 <213> *Ralstonia* sp.

[0054] <400> 1

```

cgtttaccce tegeccgggt taaccggcta tatttaagcc agaatacagg gcgtaattca      60
tcacggacat aatattaatt acatccttca tgccgtcaag caaagagggtg cttagatgag      120
aattgagaaa tacttagatc aggcgatcga acgccacggc ctgaagaacg acagcaagct      180
ggcagagatg ctaggtgtgg tgcaaagcgc ggtagccac taccgcaccg gccgccgcac      240
ggcggacaac gaagtgtgcc tccgcctggc gcagctgctc gagatggaga acccgtgccc      300
gatcatcatg gcgcccgaca tggaccgcgc cgaacgtgct ggccagcaact ctctctggga      360
agttttttcg acgaggatgg cagccagtaa cgcgacagcc gcctcctcc tggtactggt      420
cgcgagcgea acaaattttg ttgcgccctc tcccgccaaa gccgcgccgt tgagccattc      480
gacagctcaa cgattattgt tatgtaaaat agctcgccga ctccgggagc gcctacagca      540
agcgctgcgt gcagtccaaa caagcccga aacggcaccg tgctgatcga cagcacagca      600
gcagatctag cacctcccgt tccgaaacgc ctacagcaag cgctgcgtgc agtccaaaca      660
agcccgaaaa cggcaccgtg ctgatcgaca gcacagcagc agatctagea cctcccgttc      720
cgaaaacgct gcacttagca ggcgtttttt ttctgtcggg atctttcgat agtaccgatg      780
ccgagcggca tcttggtage cccggcgcag tgtccggata tgccagtaca gatgcctgat      840
ctcgcgcgcc accgcttca gttcgtcgtc tgacactgcc gattttgggt gttctgagca      900

```

gcgtagcatc ggcacgcgaa gcgatccgcc acagccagcg caaccgaaga tcgtaagcgt 960
 ttcgaaagct ggcttgacagg aaaggggggtg tttgtatgtg ggcggccctg tatgtacgta 1020
 cctggtcata cccgctgctc ggccccgcca ggcgccctcc gggcatcaac cgtcctgcaac 1080
 ctgggtcaact ctcccatgtc cccagaggggg ccccctagcg gctccgacta cggcgcggac 1140
 actccccgacg ctggacgcaa aaaaaggccg gcgatccgca cggcctttct attttctgtt 1200
 acctttctgt tactccgggt agaactccgg cgacagcacc tgctcgggta tccacggcca 1260
 ctgctcggggg aacacgtcca ggccagtctc gtccacagcc gccgagaccg catccgcca 1320
 gatctcttcc ttccaatccg gatcagccaa catcggtgc aggctgggcg tccgatgcaa 1380
 ccgcgccaga attgcgcgac gctgttctt gatcgtgcgc tgccagctcg aacccccggcg 1440
 gcccggctga tattgccaact tgagcaaatg cgccagcagt accgcatgc ggcttgccaa 1500
 ctcccgtgt tcgctcttgc ccacgtctc aatctctcc gcgatgtcc gaatgtgat 1560
 gtctgaaagc ttgccggccc gcaacagcgc cgctgtctca ctggcccacg ccaccacgtc 1620
 cactctgtag ctgcttcca taacgcgctc cctccaataa ccggatcatt ttagacgttt 1680
 cgcgttacgc cttgcgcgta acgacttgc gatcaccata aattgcctcg ccagccgctt 1740
 gcatctgcgc ctactcacc gccacagaac ggacaaacga agcgcgccac aactcggact 1800
 [0055] cccgcacctt ctggcgtgt tcgaacgtat tcgcttctc agccaacgcg agcaagtcca 1860
 gcattgcgct gaacgaaacg ggatttccgt tactcggcgt aacggatttt tgctgagact 1920
 caaacatcgc aacctctct tccaagacgc caacataacg caacgcttcc tgacgccctg 1980
 cctcgcacgt cataagctgc cggcgcaacg cctcaatctc cgcaagattt cegtactca 2040
 gcgtaacgga tttggcgcca tcgctgatct ctccctcag ccgctatc tcagcaaacg 2100
 ccttattgcg tcagcctcc gccagctcca cctggcgacg catgctcacc agatcagcgc 2160
 gaaactctc gacctccagg cggcattcat cgtaagcacc cacgtcggaa agcatttccg 2220
 ttacggctcat acgcttagta acggatttag cctcaacagg ctgctgagcc ttacggcgag 2280
 ctcgatatgc ggcttgacgc tccgcgttgg tcatagcgtg cgcttacgc ggacgaccgc 2340
 ggccacgcct ttgctccate cccggcagat cgaccgtcac attatccgtt acgtcacgca 2400
 tattcgctc ccgattgat gattccattt tacgttactg gtaacggcaa ttcaattatc 2460
 gttacaattt agttcgtaac ggaaatttcg cgagcagccc cggcgctaga cgccctcagc 2520
 gggctttgga gccgttttt ctgactgggc ggtcgcaggg gtcagctgcg ccgaaattgg 2580
 ctctcgcgc gcttgggct cgcggtaggg gtcaaacggc ggctcctga tccactcccg 2640
 aactgcatg tcategagge cggcatccgt gccttgagcc gtgtagcacg tgcacctggt 2700

	cgacgtgcag gcaccgccga tcaccgtcgg catcgagcga atctggcgca actgcgcata	2760
	ggccggcgcc gtctcaggcc ggccagagac agcagggacg aacgccgca ggatctccgc	2820
	cccgtccgtc gccgcggcgg acggaccgc cttgaccgt accgctagag ctgaagccac	2880
	accgcccctg cectgctcgg ccgcaacagg cttagccgga gtcgccgtcg tcaactggcc	2940
	ggtacggtaa tagaccgggt acgccaagaa cggcgcgac aacacgcagg cgatgaacag	3000
	catcagcacc ggcggtagcg tgtacttgcg cttgatgtgc agactggagg acttgtagag	3060
	gccgaaactg gacttcggca ggctccactt cttcttgatc ggcgcggtgt tgaacgtctc	3120
	cgggttcgcg cactccggcc attcgtagta ccagcgtccg agcaagccag cgtcccgcag	3180
	gtggacatgc tgccccacca gcttgccgat atgactgtcc aagaacgtcg ggttctcgt	3240
	gatcagaaca aacgtcacgc cggatgccc caccgtctca aacgccgca cgtggtcagg	3300
	caccttgac ccggccgtgc ggacgcgaaa caccgctgc gctcatcca acacgatcag	3360
	cgagttcggc gggaaagtga agtacggcag catcatcct gggtttcag ggtcttcg	3420
	cagctccgtc cagtccgaaa ccgccggcgt cgggatatac ggcagctca gctccgggat	3480
	gccccatgac aagagcggac gcccctggc gacggctgcc tcatcatct ggaccgcaa	3540
[0056]	ccgggtcttc ccgccaccag gcgtggccgt gatcagcgtg atcggttgcg ttgcgctcat	3600
	gtcagcttgc ccagccgctt cagagtgatc atggagatgc gcgcggtgat gccgccggcg	3660
	atgatcgaca gcccgggtgaa gacaccgccc cgcgccagga tggccgcagc aacggcaggc	3720
	atgccggcca ggctactctt ggccgcgccc agggcagcgc tcaccgccgc atccaaccg	3780
	acataggtga tcagaccgat cccgagcgc accagtagct gacgcgcgag tggccaacg	3840
	agggccatga ggaaccagc gageggcacc actctcccc ttacggcct acgccatga	3900
	cgatcagcgc agcgcaccaac catgcgcacg cgatgatgac cggtcgaaac atgtcagcac	3960
	cgtcacagac cggtttgagc gaccaagaga tcggcatgcc gtggatggag gcggtcagat	4020
	cggacggaca cgggtgcggtg tctgcgccc aaccgctgtc cggcatgacc ttgacgttga	4080
	cctgctgctc cttcagatcg ggcccgtccg gtatctcgcc ttgctcgata caaccatgc	4140
	gcgtctcatg gcccgagcac tggctgtct gccgctccgg agccttgccg ttaccagtcg	4200
	ccggatccgt cgcgggattg ccgttcgcat ccacctctg cttagcggtc gtaacgtgg	4260
	ctgtcttgc atcggaattt ggcgtgaccg tagcaacatc gcgtaacgc ttacctgtaa	4320
	cgggatcaac gtacgggtcg ctcagattga cgttgactgg agtggtggac ggcgtgagct	4380
	tcaccggaat cggcaccttg gctgcggcca tctcgtagc aacagcagcg ggcagcggat	4440
	acgtcaaacc tttgttccaa tccgcatcgc ttgcgcccac cgtcggaccg gcagggtcgg	4500

gcacacatgc cgagccactc acgacatagc catcaacgca gctggacgcc tgactcgtgc 4560
 ccgcatagaa attgtcgccg ccatcggttg tgtaatggca ctcatagctc gtcccattac 4620
 cggtagcttt catacccgcg aacttagcct tctgcccagc caaatacgcg tctgcccga 4680
 acatcgcaga gcacgcggcg ccaggagaag cagcaacgcc attcgcgata ttgccgccgg 4740
 tggcggacgt gttgtagccg taattccagc cccagccatt gaaccccggtg tcgccagcag 4800
 ccggtgaccg cttcgatgtg caccacgtac cgtccaggca ctctggatg ccgagctgcg 4860
 ccaagtaggc caacgacgtc gcggtcgcga tcgcaggcgt cgcacgaagc gcggccagcg 4920
 caacggcagc agcgccttcg cccaccgtca tcgttgccgc gatcgtggcg gcacctgcgc 4980
 caaccgcccgc acgcattctg gtagccgtcg caactcaga cagcgtcaca gcaccagtcg 5040
 tgacataccc agtccccgtc aacacgatgt tcggcggcgg aatcaacggg atggtcgaag 5100
 cccacgcgga cgacgccac cagcagagca gcagcacgag cacgcgcate acagcccct 5160
 gaaaatgatt actgccgga gaaccggcag caggaatccg gccagagcc agaaatgat 5220
 cgegagcacc acagcccctt ttcatcacc accagcgcgc aggccgccac catcgcggca 5280
 acgacgccc accccatcgt catgcatcc ttgaagetct ctgcccgtc acatgccgga 5340
 aacgacagcg acggcaacga cgcacggtc aacgtgccga cgtcccacc actgccacc 5400
 [0057] tgataccgc gcagcaccca cccgccgtg gtcttgacga actcagacag ataggtgact 5460
 gccccaggtg tctgacgagc agcagcggcg ctgtaatagg catcgtggc catgccaca 5520
 tcggcaaagc accgtgcgcc caccaacgcg ccgtcagcag ccatcacag ctccagcga 5580
 tgtacttgaa cgtcgcaatg ccgatcacga tgatcagcgc caggcccgcc agcgtggcgg 5640
 tgtccgcctt cgaatcggac atggcggtag caacgtcggc cggcaccgca gccatcgcg 5700
 aaccggccag tgcaacggta cccgcggcaa cagcagccc cttgctcttg atgctctga 5760
 acatggtttt ctcttgaga tggaggttga gaaaagctcc gggccgttca actcccagag 5820
 ccagggaaca tcacgccttc ttgggctcag cctcagcag ctgcagcggc ttgatgctc 5880
 taacgacctt ctgaccgccc ttatccttgc cgttgcctgt ctgaccacc gagacttccg 5940
 cgatgaacgg gaacgggttg tggatgatc ccttcacaac cgcagagctc tcgacttca 6000
 gctcctgcgt gcaggtgccc ttcagctct cgcacgcag ctccacatcc gtgtagatct 6060
 tcccgggtgc cagctgctt ccatccatgt tgccaacca cgtcttggcg ccccggatgg 6120
 tcacgcgtgc aatcattcc atggttccac tctcaggtt tcggcactgg atcgtgcgtg 6180
 ccgtacacgt gctcgcagc ggcggattg tgcagctgag ccggtacgcc ctgacggcgt 6240
 atcgcgaaa ccagcgcagc gatgtctcc tctgtgcagc gcagctcgt atcgaccgta 6300

	gggccgaact gcgtctggat gtgcttgagc ttgcgttcgc ggatggctc gtctgaage	6360
	tccaaggcct tgacctggtc agtaggaacg cgctgcggat ccgcagccat gaaggcctcc	6420
	agggccttgt acgcaccagc gaagtactgg tcgcgcttga taaggattc gtgcggaatc	6480
	acgegatcct tggcgcccga ctcgatctcg agacgcacce actcgctate ctgattgccg	6540
	agctggcggc cttctcgta agcccgcagc atcttgccgt tcgcccgaag gccaatctcg	6600
	aacgtcgtac cgcgacagcc cttgctgccc gccacgccgc tctcgatctt gcgatacgtc	6660
	gggatacggc cgcccgcgtt gaagtcgccc gcgtagtaca gctcttccat ctgcgcgatg	6720
	ctcacctcgc cctggcagaa gtccatgcc aggtcgcacc gcgtgatccg cgcgtcgagg	6780
	tctgcacca tcgcgtagac ggcttgccag tcgccaatcg cggcgcagcc ctgccccggc	6840
	cagtccacca ggatcgtgcc gccaacgtgc tcgcccccgc aggcaacgat ccgagcttc	6900
	atcgtctcgc cgttgatgaa cggcagcagg tcgtagctga actcataccg gcggaaccct	6960
	ttgcccgcag gcttcatcgt caccggcacc gagaacacca gctggaagta cctgcgcagc	7020
	tgctccaggc cgctcgtgat gctgccgtcg ggcaggaacg tgaactgaa ccagtccagc	7080
	atgcacctg ccttgcgttc tggacttcc cggggttta ccggaccgg ggaacggcct	7140
[0058]	gtcggcccgc cagcctcgtt ccgctcggcc cggcggccg ccatgccgtt ctgcgtgcg	7200
	agcgcggccc catgaactcc atacgeaatg cctgtgggat caagatgacg agagggggtg	7260
	ggacggagc gcacagcgt gcgcctcgc agcgatacca gtccgccaga tcggcctggc	7320
	gcgagttctt caggaggtcg tcaatcgat gcacgcagc agcgcattgc aggcagcagg	7380
	cgccgcgcag aacggcagcc atcacgatgg ccagctcgc accgtgcggg tgaagcacgt	7440
	cgccaatcag gtccagctgc ctatggtctc tctgctcat	7480

<210> 2

<211> 1137

<212> DNA

<213> Artificial

<223> elp104

<400> 2

cgcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcatagc acccaggct ttacactta	60
tgcttcgggc tegtatgtg tgtggaattg tgagcggata acaattcac acaggaaca	120
catatgaatc aatggctact ggtaggtgcc ttggcagcgc ttgccgtggg actgcgccc	180
cactatctgg atcgccgac gcagccgac tatgccaagg atttgaggg cgagatctac	240
cggatcgggg cctgcatgc cctggtgccc cgggcgcatg gcaagccgc caccagcgtg	300
gtctgctgc ccgattcct ggaggaagtc tggatttcg acggttata cgacgatecc	360
cacaccgaat gcattatct caacaacgc gattaccacg tcaccaccgt gtcgcccag	420
gcgcgaccc agcagcccga atgggatcga cccttgcct atgccgtggg caccatgcc	480
catgacgccc ccgtactgaa tctcgtgctt gaacatctgg tcatgccga tcaggtccga	540
ttgatggtc attctcggc cggcgcctg gtgctggaag cggcgtgca gcgccccgac	600
ctgcaccacc gtgcgggacg cgacatcgaa tatgtctgg aggcgctgt gttgccgag	660
ggacgcattc atcccagcct gggggtggca gccaccgggg tcgggctctg gctgctccc	720
gctgtgatgc cgctgtaca gcgctgccc atgcggcgc tgggtcgcct ggtcttcggc	780
ccccccagc gccagaagct ggagctggcc tcccgtctgt ggtcaacgc caaacggg	840
[0059] cgcaccatcg tcacgaacgt gcgcgatac gaatcctgga tggcctcgcg gaccacggct	900
gcctatgaag tctgcgggg cgcgcgtggg tggatcatgg tggccgagat ggatctgac	960
ctcagcctc gccacatggc ccgcagcgc catcaggcgg ggggcacgat caccgtctg	1020
gaaattccgg ccacctcca catgctggcc caggatgccc caggcgagat tccatgctg	1080
accggcagc aacctgctc tcgaaaacg ggttccatc atcatcatca tcatga	1137

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<223> R6Kf

<400> 3

ctgtctctta tacacatctc aaccatcatc g

31

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<223> R6Kr

<400> 4

tcactgatct agaccgccac gggtgatgag agct

34

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

[0060]

<223> elp104f

<400> 5

gtggcggctct agatcagtga tgatgatgat gatg

34

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<223> elp104r

<400> 6

ctgtctctta tacacatctc gcgcaacgca attaatgtga g

41

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	广西大学
[0003]	<120>	一种重组噬菌体的构建方法
[0004]	<130>	2021
[0005]	<160>	6
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210>	1
[0008]	<211>	7480
[0009]	<212>	DNA
[0010]	<213>	青枯雷尔氏菌(<i>Ralstonia</i> sp.)
[0011]	<400>	1
[0012]	cgtttacccc	tcgcccgggt taaccggcta tatttacgcc agaatcacgg gcgtaattca 60
[0013]	tcacggacat	aatattaatt acatccttca tgccgtcaag caaagagggt cttagatgag 120
[0014]	aattgagaaa	tacttagatc aggcgatcga acgccacggc ctgaagaacg acagcaagct 180
[0015]	ggcagagatg	ctaggtgtgg tgcaaagcgc ggctcagccac taccgcaccg gccgccgcac 240
[0016]	ggcggacaac	gaagtgtgcc tccgcctggc gcagctgtct gagatggaga acccgctgcc 300
[0017]	gatcatcatg	gcggccgaca tggaccgcgc cgaacgtgct ggccagcact ctctctggga 360
[0018]	agttttttcg	acgaggatgg cagccagtaa cgcgacagcc gccctcctcc tggtagctgt 420
[0019]	cgcgagcgca	acaatttttg ttgcgccctc tcccgccaaa gccgcgccgt tgagccattc 480
[0020]	gacagctcaa	cgattattgt tatgtaaaat agctcggcga cttcgggagc gcctacagca 540
[0021]	agcgtgcgtg	gcagtcctca caagcccga aacggcaccg tgctgatcga cagcacagca 600
[0022]	gcagatctag	cacctcccgt tccgaaacgc ctacagcaag cgctgcgtgc agtccaaaca 660
[0023]	agcccgaaaa	cggcaccgtg ctgatcgaca gcacagcagc agatctagca cctcccgttc 720
[0024]	cgaaacgcct	gcatctagca ggcgtttttt tttcgtgcgg atctttcgat agtaccgatg 780
[0025]	ccgagcggca	tcttgtagc cccggcgcag tgtccggata tgccagtaca gatgcctgat 840
[0026]	ctcgcgcgcc	acggccttca gttcgtctgc tgacactgcc gattttggtt gttctgagca 900
[0027]	gcgtagcatc	ggcacgcgaa gcgatccgc acagccagcg caaccgaaga tcgtaagcgt 960
[0028]	ttcgaaagct	ggcttcgagg aaagggggtg tttgtatgtg ggccggcctg tatgtacgta 1020
[0029]	cctggtcata	cccgtgtctc ggtcccgcc ggccgctcctc gggcatcaac cgctcctgeac 1080
[0030]	ctggtcaact	ctccatgtc cccagagggg ccccctagcg gctccgacta cggcgcggac 1140
[0031]	actcccgacg	ctggacgcaa aaaaaggccg gcgatccgca cggcctttct atttttcgtt 1200
[0032]	accttttctg	tactccgggt agaactccgg cgacagcacc tgctcgggta tccacggcca 1260
[0033]	ctgctcgggg	aacacgtcca ggccagtctc gtccacagcc gccgagaccg catccgcccc 1320
[0034]	gatctcttcc	ttcaatccg gatcagccaa catcggtgc aggctgggcg tccgatgcaa 1380
[0035]	ccgcgccaga	attgcgcgac gctgttcctt gatcgtgcgc tgccagctcg aaccccggcg 1440
[0036]	gcccggctga	tattgccact tgagcaaatg cgccagcagc accgcatgc ggcttgccaa 1500
[0037]	ctcccgtgtg	tcgctcttgc ccacgtcctc aatctcctcc gcgatgtgcc gaatgtcgat 1560
[0038]	gtctgaaagc	ttgccggccc gcaacagcgc cgctctctca ctggcccacg ccaccagctc 1620
[0039]	cacttcgtag	ctcgttccca taacgcgtc cctccaataa ccggatcatt ttagacgttt 1680
[0040]	cgcgttacgc	cttgcgcgta acgactttgc gatcaccata aattgcctcg ccagccgctt 1740
[0041]	gcatctgcgc	ctcactcagc gccacagaac ggacaaacga agcgcgccac aactcggact 1800

[0042]	cccgcacctt ctggcgctgt tcgaacgtat tcgccttcgc agccaacgcg agcaagtcca	1860
[0043]	gcattgcgtc gaacgaaacg ggatttccgt tactcggcgt aacggatttt tgctgcgact	1920
[0044]	caaacatgc aaccttctct tccaagacgc caacataacg caacgcttcc tgacgcccgt	1980
[0045]	cctcgcacgt cataagctgc cggcgcaacg cctcaatctc cgcaagattt ccgttactca	2040
[0046]	gcgtaacgga tttggcggca tcgctgatct cttccctcag ccgcctatc tcagcaaacg	2100
[0047]	ccttattgcg ttcagcctcc gccagctcca cctggcgacg catgctcacc agatcagcgc	2160
[0048]	gaaacttctc gacctccagg cggcattcat cgtaagcctc cacgtcggaa agcatttccg	2220
[0049]	ttacggteat acgcttagta acggatttag cctcaacagg ctgctgagcc ttacggcgag	2280
[0050]	ctcgatatgc ggcttgacgc tccgcgttgg tcatagcgtg cgccttacgc ggacgaccgc	2340
[0051]	ggccacgcct ttgctccatc cccggcagat cgaccgtcac attatccgtt acgtcacgca	2400
[0052]	tattcggctc ccgattgat gattccattt tacgttactg gtaacggcaa ttcaattatc	2460
[0053]	gttacaattt agttcgtaac ggaaatttcg cgagcagccc cggcgctaga cgccctcagc	2520
[0054]	gggctttgga gccgtttttt ctgactgggc ggtcgcaggg gtcagctgcg ccgaaattgg	2580
[0055]	ctcctgcgcc gcttgtggct cgcggtaggg gtcaaacggc ggctcctga tccactcccg	2640
[0056]	aaactgcatg tcatcgaggc cggcatccgt gccttgagcc gtgtagcacg tgcacctggt	2700
[0057]	cgacgtgcag gcaccgccga tcaccgtcgg catcgagcga atctggcgca actgcgcata	2760
[0058]	ggccggcgcc gtctcaggcc ggccagagac agcagggacg aacgccgcga ggatctccgc	2820
[0059]	cccgtccgtc gccgcggcgg acggaccgc cttgaccgct accgctagag ctgaagccac	2880
[0060]	accgcccctg ccctgctcgg ccgcaacagg cttagccgga gtcgccgtcg tcaactggcc	2940
[0061]	ggtacggtaa tagaccgggt acgccaagaa cgcgcgacg aacacgcagg cgatgaacag	3000
[0062]	catcagcacc ggcggtacgg tgtacttgcg cttgatgtgc agactggagg acttgtacag	3060
[0063]	gccgaaactg gacttcggca ggctccactt cttcttgatc ggcgcggtgt tgaacgtctc	3120
[0064]	cgggttcgcg cactccggcc attcgtagta ccagcgtccg agcaagccag cgtcccgcag	3180
[0065]	gtggacatgc tgccccacca gcttgcggat atgactgtcc aagaacgtcg ggttctgcgt	3240
[0066]	gatcagaaca aacgtcacgc cggtatgcc caccgtctca aacgcccca cgtggtcagg	3300
[0067]	caccttgac ccggccgtgc ggacgcgaaa caccgcgtgc gcctcatcca acacgatcag	3360
[0068]	cgagttcggc gggaaggtga agtacggcag catcatccct gggttttcag ggtcttcgcg	3420
[0069]	cagctccgtc cagtcgaaa ccgccggcgt cgggatatac ggcagcttca gctccgggat	3480
[0070]	gcccattgac aagagcggac gcccttgctc gacggtgcc ttcatcatct ggaccgcaa	3540
[0071]	cgcggtcttc ccgccaccag gcgtggccgt gatcagcgtg atcggttgcg ttgcgctcat	3600
[0072]	gtcagcttgc ccagccgctt cagagtgatc atggagatgc gcgcggtgat gccgccggcg	3660
[0073]	atgatcgaca gcccggtgaa gacaccgcc cgcgccagga tggccgcagc aacggcaggc	3720
[0074]	atgccggcca ggctactctt ggccgcgcc agggcagcgc tcaccgccgc atccaaccgc	3780
[0075]	acataggtga tcagaccgat cccgagcgc accagtagct gacgcgcgag tggcccaacg	3840
[0076]	agggccatga ggaaccacg gagcggcatc actcctccc tttacggcct acgccgatga	3900
[0077]	cgatcagcgc agcgccaac catgcgcacg cgatgatgac cggtcgaaac atgtcagcac	3960
[0078]	cgtcacagac cggtttgagc gaccaagaga tcggcatgcc gtggatggag gcggtcagat	4020
[0079]	cggacggaca cgggtcggta tctgcgccc aaccgctgtc cggcatgacc ttgacgttga	4080
[0080]	cctgctgctc cttcagatcg ggcccgtccg gtatctgcc ttgctcgata caaccatgc	4140
[0081]	gcgtctcatg gcccgagcac tggctgtcct gccgctccgg agccttgccg ttaccagtcg	4200
[0082]	ccggatccgt cgccggattg ccgttcgat ccacctctg cttagcggtc gtcaacgtgg	4260
[0083]	ctgtcttgcc atcggaattt ggcgtgaccg tagcaacatc gcggtaacgc ttacctgtaa	4320

[0084]	cgggatcaac	gtacgggtcg	ctcagattga	cgttgactgg	agtgggtggac	ggcgtgagct	4380
[0085]	tcaccggaat	cggcaccttg	gctgcggcca	tatcgctagc	aacagcagcg	ggcagcggat	4440
[0086]	acgtcaaacc	tttgttccaa	tccgcatcgc	ttgcgcccac	cgtcggaccg	gcagggtcgg	4500
[0087]	gcacacatgc	cgagccactc	acgacatagc	catcaacgca	gctggacgcc	tgactcgtgc	4560
[0088]	ccgcatagaa	attgtcgccg	ccatcgttgg	tgtaatggca	ctcatagctc	gtcccattac	4620
[0089]	cggtagcttt	catacccgcg	aacttagcct	tctgcccagc	caaatacgcg	tctgccgcca	4680
[0090]	acatcgcaga	gcacgcggcg	ccaggagaag	cagcaacgcc	attcgcgata	ttgccgcccg	4740
[0091]	tggcggacgt	gttgtagccg	taattccagc	cccagccatt	gaaccccgtg	tcgccagcag	4800
[0092]	ccggtgaccg	cttcgatgtg	caccacgtac	cgtccaggca	cttctggatg	ccgagctgcg	4860
[0093]	ccaagtaggc	caacgacgtc	gcggtcgcga	tcgcaggcgt	cgcacgaagc	gcggccagcg	4920
[0094]	caacggcagc	agcgccttcg	cccaccgtca	tcgttgccgc	gatcgtggcg	gcacctgcgc	4980
[0095]	caaccgcggc	acgcactctg	gtagccgtcg	caacttcaga	cagcgtcaca	gcaccagtgc	5040
[0096]	tgacataccc	agtccccgtc	aacacgatgt	tcggcggcgg	aatcaacggg	atggtcgaag	5100
[0097]	cccacgcgga	cgacgcccac	cagcagagca	gcagcacgag	cacgcgcatc	acagccccct	5160
[0098]	gaaaatgatt	actgccggca	gaaccggcag	caggaatccg	gccagagcc	agaaatcgat	5220
[0099]	cgcgagcatc	acagccccct	tttcatcacc	accagcggcc	aggccgccac	catcgcggca	5280
[0100]	acgacgccc	accccatcgt	catgccatcc	ttgaagctct	cttgcgggtc	acatgccgga	5340
[0101]	aacgacagcg	acggcaacga	cgcatcggtc	aacgtgccga	cgctcccac	actgccacc	5400
[0102]	tgataccgcc	gcagcaccca	cccgccctg	gtcttgacga	actcagacag	ataggtgact	5460
[0103]	gccccagggtg	tctgcgacgg	agcagcggcg	ctgtaatagg	catccgtggc	catgcccaca	5520
[0104]	tcggcaaagc	accgtgcgcc	caccaacgcg	ccgtcagcag	ccatcacacg	ctccgacgca	5580
[0105]	tgtacttgaa	cgtcgcaatg	ccgatcacga	tgatcagcgc	caggcccccc	agcgtggcgg	5640
[0106]	tgtdccctt	cgaatcggac	atggcggtag	caacgtcgg	cggcaccgca	gccatcgccg	5700
[0107]	aaccggccag	tgcaacggta	cccgcggcaa	cagcagccgc	cttgctcttg	atgctcttga	5760
[0108]	acatggtttt	ctccttgaga	tggaggttga	gaaaagctcc	gggcccgttca	actcccagag	5820
[0109]	ccaggaaca	tcacgccttc	ttgggtcag	cctcagcag	ctgcagcggc	ttgatgctcg	5880
[0110]	taacgacctt	ctgaccgccc	ttatccttgc	cgttgctcgt	ctcgaccatc	gagacttccg	5940
[0111]	cgatgaacgg	gaacgggttg	tggatgatcg	ccttcacaac	cgcagagctc	tcgacttca	6000
[0112]	gctcctgcgt	gcaggtgccc	ttcagctctt	cgccacgcag	ctccacatcc	gtgtagatct	6060
[0113]	tcccgggtgc	cagctgcttg	ccatccatgt	tgccaacca	cgtcttgccg	ccccggatgg	6120
[0114]	tcacgcgtgc	aatcatttcc	atggtttcac	tcctcaggtt	tcggcactgg	atcgtgcgtg	6180
[0115]	ccgtacacgt	gcctcggcag	ggcggatttg	tgacagctgag	ccggtacgcc	ctgacggcgt	6240
[0116]	atcgcgacaa	ccagcgcagc	gatgtcttcc	tctgtgcagc	gcagctcgta	atcgaccgta	6300
[0117]	gggcccgaact	gcgtctggat	gtgcttgagc	ttgcgttcgc	ggatggtctc	gtcctgaagc	6360
[0118]	tccaaggcct	tgacctggtc	agtaggaacg	cgctgcggat	ccgcagccat	gaaggcctcc	6420
[0119]	agggccttgt	acgcaccagc	gaagtactgg	tcgcgcttga	taaggatttc	gtgcggaatc	6480
[0120]	acgcgatcct	tggcgcgcaa	ctcgatctcg	agacgcaccc	actcgctatc	ctgattgccg	6540
[0121]	agctggcggc	ccttctcgta	agccccgagc	atcttgccgt	tcgcccagc	gccaatctcg	6600
[0122]	aacgtcgtac	cgcgacagcc	cttgetgccc	gccacgccgc	tctcgatctt	gcgatacgtc	6660
[0123]	gggatacgcc	cgcccgcgtt	gaagtcgccg	gcgtagtaca	gctcttccat	ctgcgcgatg	6720
[0124]	ctcacctcgc	cctggcagaa	gtccatcgcc	aggtcgcacc	gcgtgatccg	cgcgtcgagg	6780
[0125]	tctgcacca	tcgcgtagac	ggcttgccag	tcgccaatcg	cggtgcagcc	ctgccccggc	6840

[0126]	cagtccacca ggatcgtgcc gccaacgtgc tcgccgccgc aggcaacgat cccgagcttc	6900
[0127]	atcgtctcgc cgttgatgaa cgccagcagg tcgtagctga actcataccg gcggaacct	6960
[0128]	ttgcccgcag gcttcacgt caccggcacc gagaacacca gctggaagta cctgcgcagc	7020
[0129]	tgctccaggg cgctcgtgat gctgccgtcg ggcaggaacg tgaacttgaa ccagtccacg	7080
[0130]	atcgcacctg ccttgcgctt tggactttcc ccgggtttta ccggaccggg ggaacggcct	7140
[0131]	gtcggccgcc cagcctcgt ccgctcggcc cggtcggccg ccatgccgtt ctgcgctgcg	7200
[0132]	agcgcgggcc catgaactcc atacgcaatg cctgtgggat caagatgacg agagggggtg	7260
[0133]	ggacggacgc gcatcagcgt gcgccctcgc agcdatacca gttcgccaga tcggcctggc	7320
[0134]	gcgagttctt caggaggtcg tcaatgcgat gcatcgcagg acgcgattgc aggcagcagg	7380
[0135]	cgccgcgcag aacggcagcc atcacgatgg ccagctgcgc accgtgcggg tgaagcacgt	7440
[0136]	cgccaatcag gtccagctgc ctatggtctc tctgctgcat	7480
[0137]	<210> 2	
[0138]	<211> 1137	
[0139]	<212> DNA	
[0140]	<213> 人工序列(Artificial)	
[0141]	<400> 2	
[0142]	cgcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctattagge accccagget ttacacttta	60
[0143]	tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaca	120
[0144]	catatgaatc aatggctact ggtaggtgcc ttggcagcgc ttgccgtggg actgcgccg	180
[0145]	cactatctgg atcggccgac gcagccgatc tatgccaagg attttgaggg cgagatctac	240
[0146]	cggatcgggg cctgccatgc cctggtgcgg cgggcgcgat gcaagccgcg caccagcgtg	300
[0147]	gtctgcgtgc ccgattcct ggaggaagtc tggtatttcg acggtttata cgacgatccc	360
[0148]	cacaccgaat gcatctatct caacaacgcc gattaccacg tcaccaccgt gtcgcccag	420
[0149]	gcgcgacccc agcagcccga atgggatcga cccttgccct atgccgtggg caccatgcc	480
[0150]	catgacggg ccgtactgaa tctcgtgctt gaacatctgg ttcattgccga tcaggtccga	540
[0151]	ttgcatggtc attctcggg cggcgcctg gtgctggaag cggcgcctgca gcgccccgac	600
[0152]	ctgcaccacc gtgcgggacg cgacatcga tatgtcctgg aggcgcctgt gttgccgag	660
[0153]	ggacgattc atcccagcct gggggtgca gccaccggg tcgggctctg gctgctgccg	720
[0154]	gcgttgatgc cgctgttaca gcgctgcc atgcggcgac tgggtcgct ggtcttcggc	780
[0155]	ccccccagcg gccagaagct ggagctggcc tcccggctgt ggttcaacgc caaacggcg	840
[0156]	cgcaccatcg tcacgaacgt gcgcgatatc gaatcctgga tggcctcgcg gaccacggct	900
[0157]	gcctatgaag tcctgcgggg cgcgctggg tggatcatgg tggccgagat ggatctgatc	960
[0158]	ctagccgct gccacatggc ccgcagcgc catcagcggg ggggcacgat caccgtctg	1020
[0159]	gaaattccgg ccacctcca catgctggcc caggatgcc caggcgagat tccatgctg	1080
[0160]	accggcagcg aacctgcctc tcgcaaaacg gtttccatc atcatcatca tcaactga	1137
[0161]	<210> 3	
[0162]	<211> 31	
[0163]	<212> DNA	
[0164]	<213> 人工序列(Artificial)	
[0165]	<400> 3	
[0166]	ctgtctetta tacacatctc aaccatcatc g	31
[0167]	<210> 4	

[0168]	<211>	34	
[0169]	<212>	DNA	
[0170]	<213>	人工序列(Artificial)	
[0171]	<400>	4	
[0172]		tcaactgatct agaccgccac ggttgatgag agct	34
[0173]	<210>	5	
[0174]	<211>	34	
[0175]	<212>	DNA	
[0176]	<213>	人工序列(Artificial)	
[0177]	<400>	5	
[0178]		gtggcggctct agatcagtga tgatgatgat gatg	34
[0179]	<210>	6	
[0180]	<211>	41	
[0181]	<212>	DNA	
[0182]	<213>	人工序列(Artificial)	
[0183]	<400>	6	
[0184]		ctgtctcttta tacacatctc gcgcaacgca attaattgta g	41

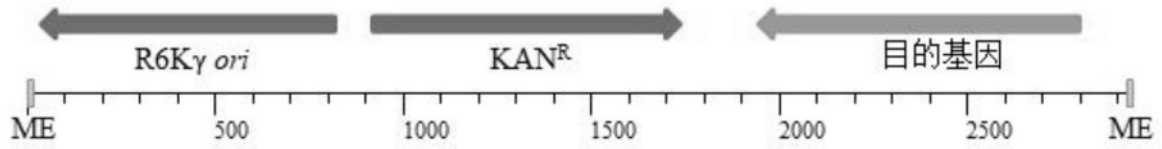


图1

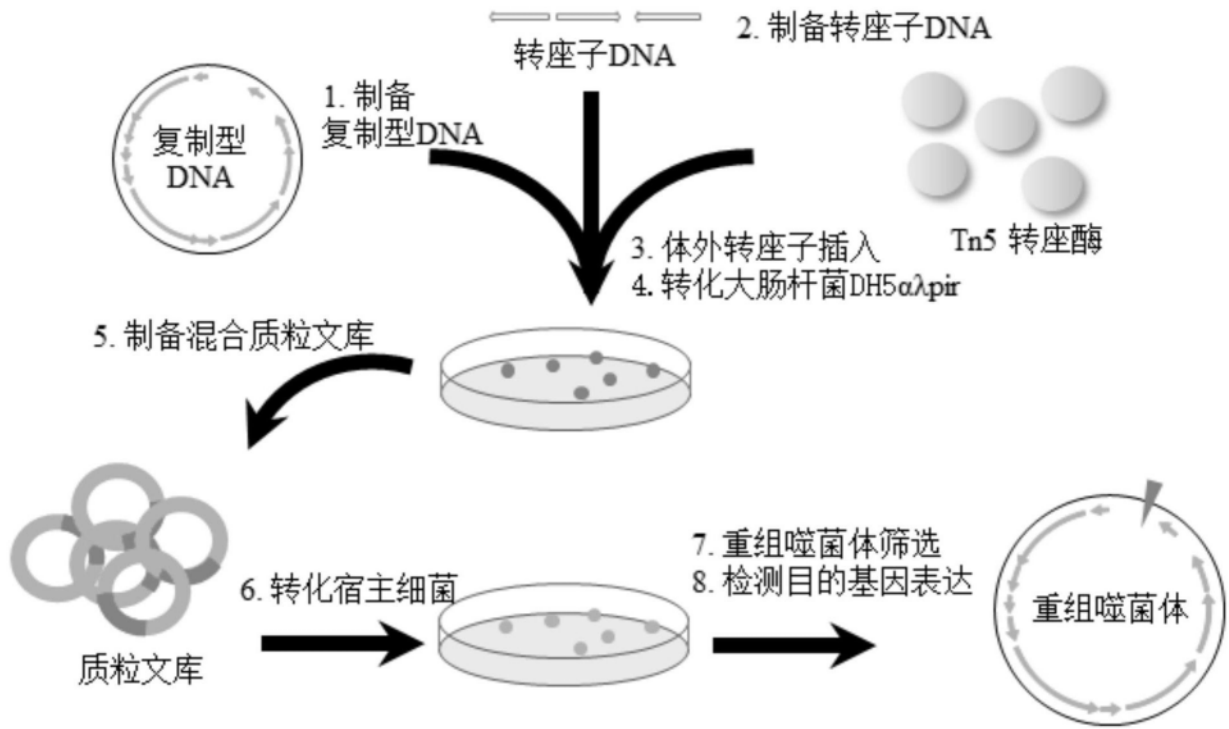


图2

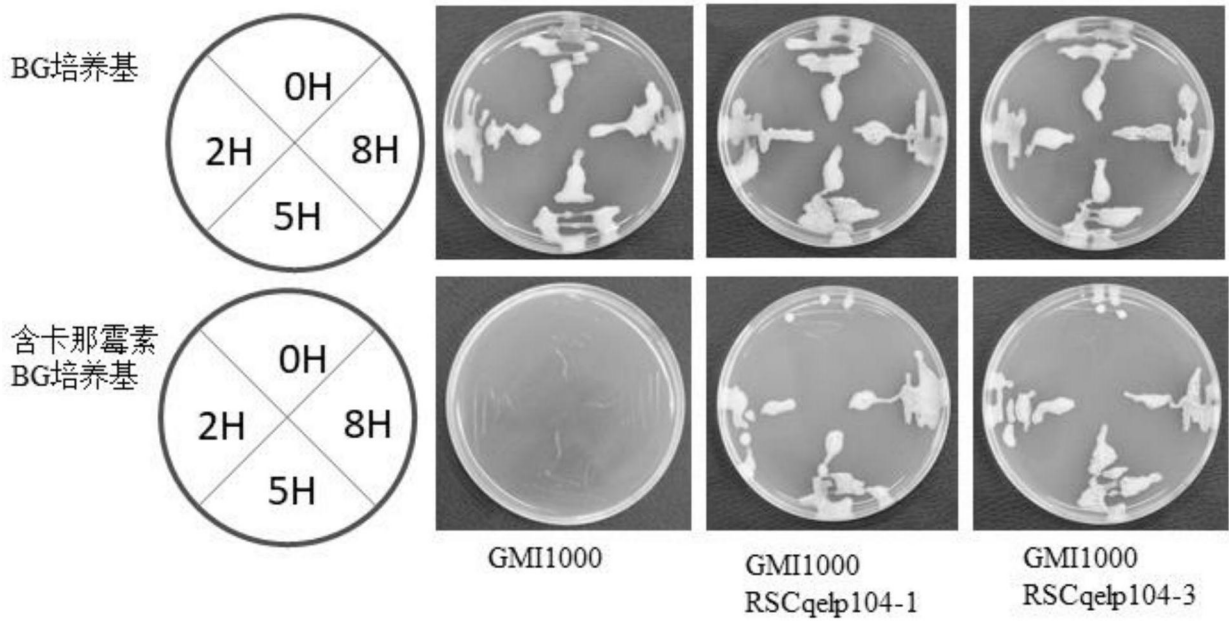


图3

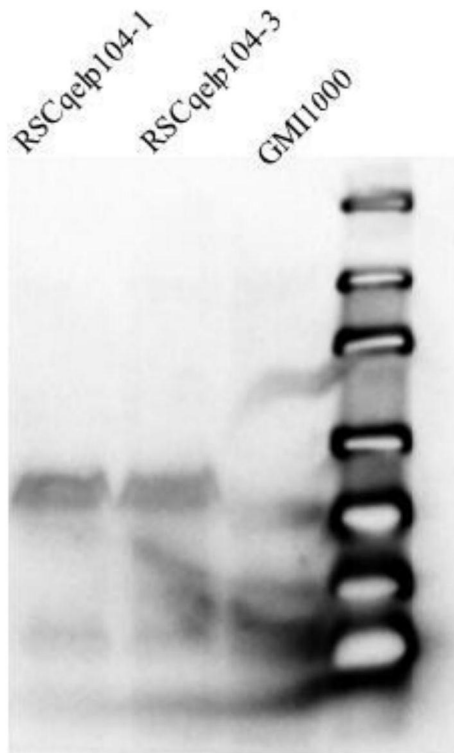


图4

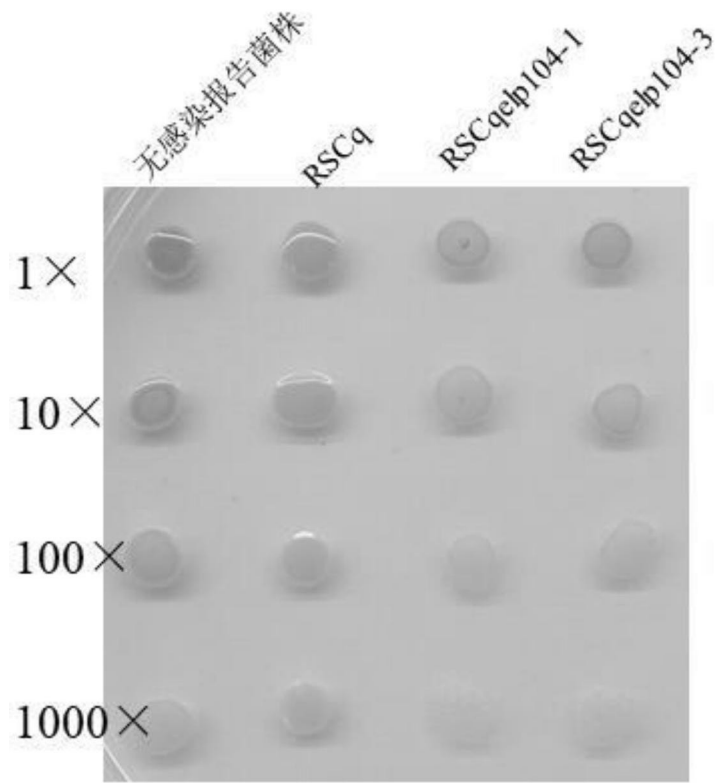


图5