



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111074004 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 10

(21) 申请号 202010049859.7

(22) 申请日 2020.01.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111074004 A

(43) 申请公布日 2020.04.28

(73) 专利权人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72) 发明人 周素娟

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225
专利代理师 褚明伟

(51) Int. Cl.
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108866207 A, 2018.11.23
CN 107619854 A, 2018.01.23
CN 110527745 A, 2019.12.03
US 2014106340 A1, 2014.04.17
CN 103966356 A, 2014.08.06
陈瑶等. HIV-1 耐药基因检测的研究进展. 《分子诊断与治疗杂志》. 2017,
Shivani Gupta等. A Robust PCR Protocol for HIV Drug Resistance Testing on Low-Level Viremia Samples. 《BioMed Research International》. 2017,
Zhiying Liu等. Development of an In-House Multiplex Nested RT-PCR Method for Detecting Acute HIV-1 Infection in High Risk Populations. 《Curr HIV Res》. 2015,

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书13页
序列表3页 附图7页

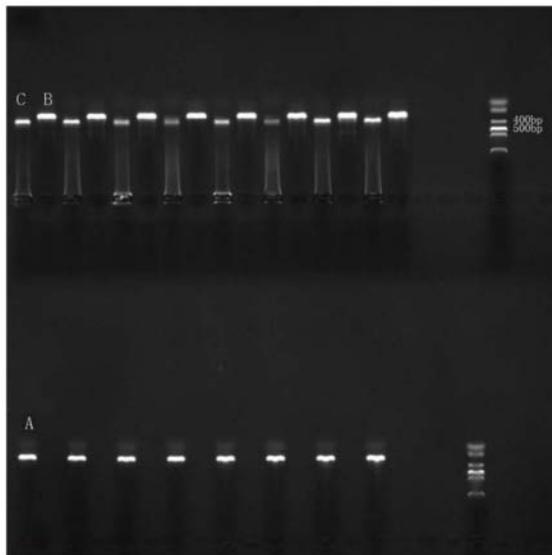
(54) 发明名称

人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型检测法及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型检测法及试剂盒,属于分子生物技术领域。具体而言,本发明提供了用于检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的引物组,用来扩增POL基因区的PR区(A区)和RT区(B区+C区),包括RT-PCR的引物、巢式PCR第2轮的引物、测序引物。还提供了高效检测HIV-1耐药基因型的三段RT-PCR方法以及试剂盒。与现有技术相比,本发明是在常规的in-house一段法扩增基础上进行大量改进,重新设计引物和更改了相应的扩增反应体系和反应条件,容易掌握,特异性强,灵敏度也提高了很多。本发明的方法能够高效得扩增耐药分析的POL基因序列,这为更全面得耐药分析等提供了更加完善的重要的数据。

CN 111074004 B



1. 用于检测人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型的引物组,其特征在于,由引物A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4组成,

A1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

A2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

A3的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

A4的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

B1的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

B2的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

B3的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

B4 的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;

C1 的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示;

C2 的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示;

C3 的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;

C4 的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;

SEQ ID NO.1~12所示的核苷酸序列中的R为A/G,Y为C/T,B为G/T/C ,K 为G/T ,W为A/T,N为A/T/C/G;

其中,在常用的in-house基因型耐药检测HXB2株的pol基因扩增区域2243-3326nt之间设计引物分三段A区、B区、C区进行扩增,A区为2245-2583nt,B区为2615 -2951nt,C区为2880-3326nt,A1和A2、B1和B2、C1和C2分别为A区、B区、C区的巢式PCR第1轮的上下游引物,A3和A4、B3和B4、C3和C4分别为A区、B区、C区的巢式PCR第2轮的上下游引物,同时A3和A4、B3和B4、C3和C4也分别是A区、B区、C区的测序引物。

2. 根据权利要求1所述用于检测人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型的引物组,其特征在于,所述引物组能够检测的HIV-1亚型选自CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC、CRF_5501B、CRF_57BC、CRF_62_BC、CRF_65cpx、CRF79_0107、CRF_85_BC、CRF86_BC、CRF80_0107、CRF100_01C或CRF101_01B。

3. 权利要求1或2所述用于检测人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型的引物组的应用,其特征在于,所述引物组在制备HIV-1耐药检测试剂盒中的应用。

4. 一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1或2所述用于检测人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型的引物组。

人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型检测法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物技术领域,尤其是涉及一种检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)PR和RT区耐药突变的引物组,一种检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型检测法(三段法PCR-测序法)及试剂盒。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)感染者,会引起获得性免疫缺陷综合症(Acquired Immune Deficiency Syndrome,AIDS)即艾滋病。高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral treatment,HAART)又叫鸡尾酒疗法,通过三种或者三种以上的药物联合治疗HIV感染者,按其作用原理将抗病毒药物分为核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)、非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)、蛋白酶抑制剂(PIs)、融合抑制剂(FIs)、共受体抑制剂(co-receptor inhibitors)和整合酶抑制剂(integrase inhibitors)。这些药物的联合使用有效降低了HIV感染相关疾病的发病率和死亡率,延长了HIV感染者寿命,但治疗中产生的毒株耐药性问题又成为抗病毒治疗失败的最主要原因。由于艾滋病病毒本身高速复制及复制过程中缺乏自我校对功能等原因,易发生基因突变产生耐药。同时,在长期抗病毒治疗药物选择性压力作用下,艾滋病病毒耐药突变几率大大增加。获得性(ADR)和传播性耐药性(TDR)都会增加治疗失败、艾滋病毒疾病进展的风险,以及需要更昂贵的二线和三线治疗方案。通过对患者体内毒株的基因型耐药分析结果,可以让医生帮助病人选择更合适的治疗方案。

[0003] RT-PCR-测序法是最常用的基因型耐药分析方法。RT-PCR扩增HIV-1的PR(Protease)基因区aa1-aa99和RT区(Reverse Transcriptase)aa20~aa230氨基酸位点,将扩增成功的基因片段进行测序,并将序列提交到斯坦福大学的HIV耐药数据库(<http://hivdb.stanford.edu/>)。根据2014年WHO耐药监测指南推荐的12种监测药物中有 ≥ 1 种耐药评分 ≥ 15 ,即判定为耐药。

[0004] 所以PCR扩增基因序列成功是进行耐药分析的前提。如果病人的病毒载量较低或者实际操作中由于标本分散采集而集中检测,标本中HIV-1核酸质量下降,常常会出现扩增失败,无法获得病人体内的毒株耐药情况。

[0005] 虽然国内外市场上也出现了一些商业化的检测试剂盒,但由于HIV-1变异大,基因亚型复杂,最终仅涵盖了中国主要的流行的几个毒株亚型,对一些重组型或者独特重组亚型或者新亚型无法检测到。

[0006] 国内in-house的基因型耐药检测可以覆盖各个亚型的毒株。通常是巢式PCR法扩增耐药发生的POL基因区的大于1000bp片段。在扩增成功的情况可以完整的分析毒株的耐药情况。但由于扩增片段较长,并且HIV-1变异大,实际操作样本扩增成功率一般在80%多,抗病毒治疗中的样本的扩增成功率更低些。并且由于HIV-1变异大,HIV-1 database里每年新发现的CRFs在更新,而以往的in-house法中的常用引物却没有参考新的CRFs的信息进行更新,最终会导致引物很难结合到部分样本上导致扩增失败而无法获取基因型耐药分析结

论。这对大样本调查研究中,将会有很多病人体内的毒株耐药情况无法获知。对个体在抗病毒治疗前的耐药检测数据缺失将导致无法指导临床医生制定精准的抗病毒治疗方案。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一在于,提供检测HIV-1基因PR区和RT区基因突变和基因型耐药分析的引物组,即高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的引物组。

[0008] 本发明的目的之二在于,提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的三段RT-PCR方法。

[0009] 本发明的目的之三在于,提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的试剂盒,即三段法HIV基因型耐药检测试剂盒。

[0010] 本发明既能在原来的RT-PCR-测序法基础上提高基因扩增的成功率(敏感度),也能覆盖各种亚型毒株。本发明基于一代测序平台,具有同时检测突变位点多、准确度高、样本易获取等优点。

[0011] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0012] 本发明提供一种用于检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的引物组,用来扩增POL基因区的PR区(A区)和RT区(B区+C区)。包括RT-PCR的引物、巢式PCR第2轮的引物、测序引物;引物分别为A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4。

[0013] A1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0014] A2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0015] A3的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0016] A4的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0017] B1的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

[0018] B2的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

[0019] B3的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

[0020] B4的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;

[0021] C1的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示;

[0022] C2的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示;

[0023] C3的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;

[0024] C4的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;

[0025] 具体而言,A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4序列分别如下:

[0026] A1:5'-TGAAAGAYTGYACTGARAGRCAGGCBAAT-3';

[0027] A2:5'-CTTCTGTCAATGGYCAYTGB-3';

[0028] A3:5'-TTAACYTCCCTCARATCACT-3';

[0029] A4:5'-TTTTACTGGTACAGTTTTYAATRGG-3';

[0030] B1:5'-AGTCCYATTGAAACTGTRCCAG-3';

[0031] B2:5'-ATTGCTGGTGATCCYTTCCA-3';

[0032] B3:5'-ACAATGGCCATTGACARARG-3';

[0033] B4:5'-CTAGGTATGGTGAAGKGCAG-3';

[0034] C1:5'-AGGAATACCACCCNGCRG-3';

[0035] C2:5' -ATCCCTGCRTAAATYTGACTTGC-3' ;

[0036] C3:5' -TGTGGGNGATGCATWYTTYT-3' ;

[0037] C4:5' -CTTCTGTATGTCATTGACRGTC-3' 。

[0038] SEQ ID NO.1~12所示的核苷酸序列中的R为A/G,Y为C/T,B为G/T/C,K为G/T,W为A/T,N代表A/T/C/G,另外,本发明技术方案实际生产和操作时可以使用I(次黄嘌呤)取代N进行合成引物,以提高引物浓度和结合效率。

[0039] 本发明在常用的in-house基因型耐药检测的pol基因扩增区域2243-3326的1084bp之间设计引物分三段A区、B区、C区进行扩增。具体得,A区(2245-2583nt,HXB2),B区(2615-2951nt,HXB2),C区(2880-3326nt,HXB2),每个区对应一组引物。每组引物均含有巢式PCR第1轮上游特异序列和下游特异序列、第2轮上游特异序列和下游特异序列组成。

[0040] A区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。

[0041] A区的测序引物具有序列SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区的测序引物具有序列SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区的测序引物具有序列SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。

[0042] 最终耐药分析的PR区(A区)和RT区(B区+C区序列拼接成RT区)达到和一段法相同的耐药基因型分析区域。

[0043] 本发明要解决的技术问题是对HIV POL区(PR区和RT区)进行耐药分析时,一段法PCR法扩增失败的样本无法获得耐药情况,通过在POL区内设计3组特异性强的引物组扩增3个小片段A区、B区、C区,再将PR区(A区)和RT区(B区+C区拼接)分析结果合并达到与1084bp一段法相同的分析结论,本发明提高了扩增的敏感度和成功率。

[0044] 进一步地,所述引物组能够检测的HIV-1亚型包括但不限于:CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC、CRF_5501B、CRF_57BC、CRF_62_BC、CRF_65cpx、CRF79_0107、CRF_85_BC、CRF86_BC、CRF80_0107、CRF100_01C、CRF101_01B。

[0045] 本发明提供的引物组参考了我国流行的主要亚型CRF01_AE、CRF07_BC,HIV database里中国地区发现上传的以往的以及最新的CRFs以及本申请发明人所在课题组尚未上传和公开的2000多条HIV pol区基因序列。本发明将上述HIV病毒亚型的序列进行多序列比对寻找到不同亚型的保守区域。在保守区域设计引物,可以实现对不同HIV亚型进行扩增。

[0046] HIV-1变异性大,本发明引进了简并碱基(混合碱基),以保证不同亚型在引物区域发生碱基突变时能很好得与模板结合。由于简并碱基的过多加入,会最终导致有效引物浓度下降。根据引物设计原则,扩增是从3'端开始的,3'端的碱基不能发生错配,保留3'端以及靠近3'端的简并碱基,舍弃5'端的简并碱基最终既保证引物的特异性结合,又保证引物的有效浓度。

[0047] 本发明还提供上述引物组的应用,所述引物组在对HIV POL区耐药检测进行巢式PCR三段法扩增中使用,或,所述引物组在HIV-1耐药检测试剂盒中的应用。

[0048] 在耐药检测扩增HIV POL区时,采用上述引物进行巢式PCR扩增。

[0049] 本发明还提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的三段RT-PCR方法,包括如下步骤:

[0050] a1.提取血浆或血清样本病毒RNA;

[0051] a2.用上述引物对POL耐药检测的A区、B区、C区分别进行巢式PCR扩增;

[0052] a3.将巢式PCR扩增的结果进行电泳,电泳结果在目标条带位置的样本进行测序,并拼接序列上传分析。

[0053] 优选地,步骤a1提取血浆或血清样本病毒RNA可使用市场化的自动抽提仪或人工柱式抽提法。

[0054] 优选地,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第一轮体系如下:

[0055] 在PCR准备间安全柜内进行,注意配置过程应在冰上进行。推荐使用One Step RNA PCR Kit (AMV) (大连,Takara公司),引物的使用浓度为40 μ M,反应总体积25 μ l。A区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,引物A1 0.5ul,引物A2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul;B区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,B1 0.5ul,B2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul;C区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,C1 0.5ul,C2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul。

[0056] 优选地,A区、B区、C区巢式PCR第一轮扩增程序均相同,为:48 $^{\circ}$ C 50分钟;94 $^{\circ}$ C 2分钟;94 $^{\circ}$ C 15秒,50 $^{\circ}$ C 20秒,72 $^{\circ}$ C 1分钟,40cycles;72 $^{\circ}$ C 10分钟,4 $^{\circ}$ C 保温。

[0057] 优选地,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第二轮体系如下:第二轮的模板为第一轮的PCR产物。推荐使用PerfectshotTM Ex Taq Mix (大连,Takara公司),引物的使用浓度为40 μ M,反应总体积50 μ l。A区:2*PCR Mixture 25ul,A3 1ul,A4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(A区第一轮PCR产物) 5ul。B区:2*PCR Mixture 25ul,B3 1ul,B4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(B区第一轮PCR产物) 5ul。C区:2*PCR Mixture 25ul,C3 1ul,C4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(C区第一轮PCR产物) 5ul。

[0058] 优选地,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第二轮扩增程序均相同。94 $^{\circ}$ C 4分钟;94 $^{\circ}$ C 12秒,55 $^{\circ}$ C 20秒,72 $^{\circ}$ C 1分钟,40cycles;72 $^{\circ}$ C 10分钟,4 $^{\circ}$ C 保温。

[0059] 优选地,步骤a3所述的PCR产物进行电泳。

[0060] 优选地,步骤a3所述的测序引物,A区的测序引物具有序列SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区的测序引物具有序列SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区的测序引物具有序列SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。PR和RT区的序列拼接常规的使用Lasergene中的SeqMan程序,将序列以Fasta格式导出,上传序列到<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences>网站,勾选全部20种药物,网站服务器给出20种药物的耐药打分情况。表1列出了临床可鉴定的耐药品种,表2临床实验中可检出的耐药突变类型。表1和表2供耐药分析结果参考。

[0061] 表1临床可鉴定的耐药品种

[0062]	RT 区的耐药突变	核苷类反转录酶抑制剂 (NRTIs) Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	阿巴卡韦 abacavir (ABC)
			齐多夫定 zidovudine (AZT)
			司他夫定 stavudine (D4T)
			去羟基苷 didanosine (DDI)
			恩曲他滨 emtricitabine (FTC)
			拉米夫定 lamivudine (3TC)
			替诺福韦 tenofovir (TDF)
	非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTIs) Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	依非韦伦 efavirenz (EFV)	
		依曲韦林 etravirine (ETR)	
		奈韦拉平 nevirapine (NVP)	
利匹韦林 rilpivirine (RPV)			
多拉韦林 doravirine (DOR)			
[0063]	PR 区的耐药突变	蛋白酶抑制剂 (PIs) Protease Inhibitors	阿扎那韦 atazanavir/r (ATV/r)
			地瑞那韦 darunavir/r (DRV/r)
			福沙那韦 fosamprenavir/r (FPV/r)
			茚地那韦 indinavir/r (IDV/r)
			克力芝 lopinavir/r (LPV/r)
			沙奎那韦 saquinavir/r (SQV/r)
			替普那韦 tipranavir/r (TPV/r)
			奈非那韦 nelfinavir (NFV)

[0064] 除了耐药分析,网站服务器也会将耐药位点突变的发生情况进行罗列。

[0065] 表2临床实验中可检出的耐药突变类型

HIV-1 RT 区和 PR 区耐药基因突变鉴定表					
NRTIs		NNRTIs		PIs	
M41	L	L100	I	L23	I
K65	R	K101	E,P	L24	I
D67	N,G,E	K103	N,S	D30	N
T69	D,ins	V106	M,A	V32	I
K70	R,E	V179	F	M46	I,L
L74	V,I	Y181	C,I,V	I47	V,A
V75	M,T,A,S	Y188	L,H,C	G48	V,M
[0066] F77	L	G190	A,S,E	I50	V,L
Y155	F	P225	H	F53	F,Y
F116	Y	M230	L	I54	V,L,M,A,T,S
Q151	M			G73	S,T,C,A
M184	V,I			L76	V
L210	W			V82	A,T,F,S,C,M,L
T215	Y,F,I,S,C,D,V,E			N83	D
K219	Q,E,N,R			I84	V,A,C
				I85	V
				N88	D,S
[0067]				L90	M

[0068] 本发明还提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的试剂盒,即三段法HIV基因型耐药检测试剂盒。所述试剂盒包括本发明所述的引物组。

[0069] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:

[0070] 针对耐药检测中存在病毒载量低或样本有所降解等原因导致的巢式PCR扩增失败而无法获得POL区基因序列进行耐药分析的情况,本申请利用扩增3个小片段进行拼接的方法提高扩增率。设计的引物由于参考了国内大量近几年新发感染者的各个亚型序列(包括本申请发明人坐在课题组一些尚未上传到database里的2000多条序列),针对引物区有碱基突变的进行了碱基简并,能特异性得结合到不同亚型的基因片段上。

[0071] 本发明是在常规的in-house一段法扩增基础上进行大量改进,重新设计引物和更改了相应的扩增反应体系和反应条件,容易掌握,特异性强,灵敏度也提高了很多。当病人

病毒载量较低、样本保存不当有降解发生等使用普通的一段法巢式PCR扩增1000bp以上长片段失败的情况,本发明中的方法仍然能够高效得扩增耐药分析的POL基因序列,这为更全面得耐药分析等提供了更加完善的重要的数据。

附图说明

- [0072] 图1 8例HIV-1阳性标本使用三段法PCR扩增A区、B区、C区凝胶电泳图;
- [0073] 图2阴影部分的序列为引物A1所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0074] 图3阴影部分的序列为引物A2所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0075] 图4阴影部分的序列为引物A3所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0076] 图5阴影部分的序列为引物A4所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0077] 图6阴影部分的序列为引物B1所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0078] 图7阴影部分的序列为引物B3所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0079] 图8阴影部分的序列为引物B2所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0080] 图9阴影部分的序列为引物B4所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0081] 图10阴影部分的序列为引物C1所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0082] 图11阴影部分的序列为引物C2所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0083] 图12阴影部分的序列为引物C3所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0084] 图13阴影部分的序列为引物C4所在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果;
- [0085] 图14 A区 (PR区) 序列上传到斯坦福大学的HIV耐药数据库后得到的耐药分析结果;
- [0086] 图15与A区同一个样本的C区+B区拼接后的RT区序列上传到斯坦福大学的HIV耐药数据库后得到的耐药分析结果。

具体实施方式

[0087] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0088] 实施例1

[0089] 本实施例提供一种用于检测人类免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 耐药基因型的引物组,用来扩增POL基因区的PR区 (A区) 和RT区 (B区+C区)。包括RT-PCR的引物、巢式PCR第2轮的引物、测序引物;引物分别为A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4。

[0090] A1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0091] A2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0092] A3的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0093] A4的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0094] B1的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

[0095] B2的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

[0096] B3的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

[0097] B4的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;

[0098] C1的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示;

[0099] C2的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示;

- [0100] C3的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示;
- [0101] C4的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示;
- [0102] 具体而言,A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4序列分别如下:
- [0103] A1:5'-TGAAAGAYTGYACTGARAGRCAGGCBAAT-3';2057-2085;
- [0104] A2:5'-CTTCTGTCAATGGYCAYTGB-3';2615-2634;
- [0105] A3:5'-TTAACYTCCCTCARATCACT-3';2245-2264;
- [0106] A4:5'-TTTTACTGGTACAGTTTTYAATRGG-3';2560-2583;
- [0107] B1:5'-AGTCCYATTGAAACTGTRCCAG-3';2556-2574;
- [0108] B2:5'-ATTGCTGGTGATCCYTTCCA-3';3007-3026;
- [0109] B3:5'-ACAATGGCCATTGACARARG-3';2615-2634;
- [0110] B4:5'-CTAGGTATGGTGAAGKGCAG-3';2933-2951;
- [0111] C1:5'-AGGAATACCACACCCNGCRG-3';2826-2845;
- [0112] C2:5'-ATCCCTGCRTAAATYTGACTTGC-3';3370-3348;
- [0113] C3:5'-TGTGGNGATGCATWYTTYT-3';2880-2899;
- [0114] C4:5'-CTTCTGTATGTCATTGACRGTCC-3' 3326-3304。
- [0115] SEQ ID NO.1~12所示的核苷酸序列中的R为A/G,Y为C/T,B为G/T/C,K为G/T,W为A/T,N代表A/T/C/G,另外,本发明技术方案实际生产和操作时可以使用I(次黄嘌呤)取代N进行合成引物,以提高引物浓度和结合效率。
- [0116] 本实施例在常用的in-house基因型耐药检测的pol基因扩增区域2243-3326的1084bp之间设计引物分三段A区、B区、C区进行扩增。具体得,A区(2245-2583nt,HXB2),B区(2615-2951nt,HXB2),C区(2880-3326nt,HXB2),每个区对应一组引物。每组引物均含有巢式PCR第1轮上游特异序列和下游特异序列、第2轮上游特异序列和下游特异序列组成。
- [0117] A区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区基因扩增对应的引物组具有序列SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。
- [0118] A区的测序引物具有序列SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区的测序引物具有序列SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区的测序引物具有序列SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。
- [0119] 最终耐药分析的PR区(A区)和RT区(B区+C区序列拼接成RT区)达到和一段法相同的耐药基因型分析区域。
- [0120] 本实施例提供的引物组参考了我国流行的主要亚型CRF01_AE、CRF07_BC,HIV database里中国地区发现上传的以往的以及最新的CRFs以及本申请发明人所在课题组尚未上传和公开的2000多条HIV pol区基因序列。本发明将上述HIV病毒亚型的序列进行多序列比对寻找到不同亚型的保守区域。在保守区域设计引物,可以实现对不同HIV亚型进行扩增。
- [0121] HIV-1变异性大,本发明引进了简并碱基(混合碱基),以保证不同亚型在引物区域发生碱基突变时能很好得与模板结合。由于简并碱基的过多加入,会最终导致有效引物浓度下降。根据引物设计原则,扩增是从3'端开始的,3'端的碱基不能发生错配,保留3'端以

及靠近3'端的简并碱基,舍弃5'端的简并碱基最终既保证引物的特异性结合,又保证引物的有效浓度。图2~13为引物在序列中的位置和与部分参考序列的比对结果。

[0122] 本实施例还提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的三段RT-PCR方法,包括如下步骤:

[0123] a1.提取血浆或血清样本病毒RNA;

[0124] a2.用上述引物对POL耐药检测的A区、B区、C区分别进行巢式PCR扩增;

[0125] a3.将巢式PCR扩增的结果进行电泳,电泳结果在目标条带位置的样本进行测序,并拼接序列上传分析。

[0126] 本实施例中,步骤a1提取血浆或血清样本病毒RNA可使用市场化的自动抽提仪或人工柱式抽提法。

[0127] 本实施例中,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第一轮体系如下:

[0128] 在PCR准备间安全柜内进行,注意配置过程应在冰上进行。推荐使用One Step RNAPCR Kit (AMV) (大连,Takara公司),引物的使用浓度为40 μ M,反应总体积25 μ l。A区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,引物A1 0.5ul,引物A2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul;B区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,B1 0.5ul,B2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul;C区:10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,C1 0.5ul,C2 0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,步骤a1中产生的RNA模板5ul。

[0129] 本实施例中,A区、B区、C区巢式PCR第一轮扩增程序均相同,为:48 $^{\circ}$ C 50分钟;94 $^{\circ}$ C 2分钟;94 $^{\circ}$ C 15秒,50 $^{\circ}$ C 20秒,72 $^{\circ}$ C 1分钟,40cycles;72 $^{\circ}$ C 10分钟,4 $^{\circ}$ C 保温。

[0130] 本实施例中,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第二轮体系如下:第二轮的模板为第一轮PCR产物。推荐使用PerfectshotTM Ex Taq Mix (大连,Takara公司),引物的使用浓度为40 μ M,反应总体积50 μ l。A区:Mixture 25ul,A3 1ul,A4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(A区第一轮PCR产物) 5ul。B区:Mixture 25ul,B3 1ul,B4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(B区第一轮PCR产物) 5ul。C区:Mixture 25ul,C3 1ul,C4 1ul,ddH₂O 18ul,模板(C区第一轮PCR产物) 5ul。

[0131] 本实施例中,步骤a2所述A区、B区、C区巢式PCR第二轮扩增程序均相同。94 $^{\circ}$ C 4分钟;94 $^{\circ}$ C 12秒,55 $^{\circ}$ C 20秒,72 $^{\circ}$ C 1分钟,40cycles;72 $^{\circ}$ C 10分钟,4 $^{\circ}$ C 保温。

[0132] 本实施例中,步骤a3所述的PCR产物进行电泳,电泳结果见图1。A区、B区、C区的片段长度分别为339bp,337b,447bp,其中A区和B区在接近400bp的位置,为目标条带位置;C区在400bp和500bp之间,为目标条带位置。

[0133] 引物验证(1)分别选取8个HIV-1阳性标本、8个HIV-1阴性标本、8个HCV阳性标本(和HIV-1一样均为RNA病毒),采用常规的商业RNA提取试剂盒或常规生物标本RNA提取方法提取标本RNA,

[0134] (2)按照步骤a1,a2,a3所述引物和扩增程序对上述标本RNA进行分区巢式PCR扩增反应,图1为编号1-8的8个HIV-1抗体阳性的样本,分别进行A区、B区、C区进行扩增,将PCR产物使用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,A区、B区、C区的电泳条带在目标条带位置(其结果如图1所示),后续测序结果证实所扩增片段均为HIV-1POL基因片段;而对照8个HIV-1阴性标本、8个HCV阳性标本均无扩增条带。对照的结果说明本发明的设计的PCR引物和扩增技术

特异性高。

[0135] 步骤a3所述的测序引物,A区的测序引物具有序列SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的碱基序列;B区的测序引物具有序列SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8的碱基序列;C区的测序引物具有序列SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12的碱基序列。PR和RT区的序列拼接常规的使用Lasergene中的SeqMan程序,将序列以Fasta格式导出,上传序列到<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences>网站,勾选全部20种药物,网站服务器给出20种药物的耐药打分情况。

[0136] 网站分析结果图示见附图14~15,附图14为PR区(A区)的8种药物的耐药情况和耐药突变位点情况,附图15为RT区(B区+C区)的12种药物的耐药情况和耐药突变位点情况。

[0137] 图14上传的PR区的样本序列(A区)如SEQ ID NO.13所示,具体为:ACCTCARATCACTCTTTGGCAACGACCCGTTGTCACAGTAAAAATAGAAGGACAGCTGAGGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAGATAAATTTGCCAGGAAAATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAATATGATCAGATAAGTATAGAAATTTGTGGAAAAAAGGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGACGAAATCTGTTGACTCAGCTTGGTTGCACTTTAAATTTTCC。

[0138] 图15上传的RT区的样本序列(B区和C区的拼接)如SEQ ID NO.14所示,具体为:AAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAGCATTAAACAGAAATTTGTAAGGAGATGGAAGAGGAAGGAAAAATCTCAAAAATTGGGCCTGAAAACCCATATAATACTCCAGTATTTGCTATAAAGAAAAAGGACAGCACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGGGAGCTCAATAAAGAAGTCAAGATTTTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCGCATCCAGCAGGTTTAAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTGGGAGATGCATATTTTTTCAGTGCCATTAGATAAAGAATTTAGGAAGTATACTGCATTCACCATACCTAGTACAAACAATGAGACACCAGGAATCAGATATCAGTACAATGTGCTGCCACAAGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTTCCAAGCTAGCATGACAAAAATATTAGAGCCTTTTGAATAAAAAATCCAGAAATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGCTCTGATTTAGAAATAGGGCAGCACAGAACAAAAATAGAAGAGCTAAGAGCTCATCTATTGAAATGGGGATTTACTACACCAGACAAAAAGCATCAAAGGAACCCCATTCCTTTGGATGGGATATGAACTCCATCCTGACAAATGGACAGTTCAGCCTATAAACTGCCAGAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATG。

[0139] 表1列出了临床可鉴定的耐药品种,表2临床实验中可检出的耐药突变类型。表1和表2供耐药分析结果参考。

[0140] 表1临床可鉴定的耐药品种

[0141]	RT 区的耐药突变	核苷类反转录酶抑制剂 (NRTIs) Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	阿巴卡韦 abacavir (ABC)
			齐多夫定 zidovudine (AZT)
			司他夫定 stavudine (D4T)
			去羟基苷 didanosine (DDI)
			恩曲他滨 emtricitabine (FTC)
			拉米夫定 lamivudine (3TC)
			替诺福韦 tenofovir (TDF)
	非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTIs) Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	依非韦伦 efavirenz (EFV)	
		依曲韦林 etravirine (ETR)	
		奈韦拉平 nevirapine (NVP)	
		利匹韦林 rilpivirine (RPV)	
		多拉韦林 doravirine (DOR)	
	PR 区的耐药突变	蛋白酶抑制剂 (PIs) Protease Inhibitors	阿扎那韦 atazanavir/r (ATV/r)
			地瑞那韦 darunavir/r (DRV/r)
福沙那韦 fosamprenavir/r (FPV/r)			
茚地那韦 indinavir/r (IDV/r)			
克力芝 lopinavir/r (LPV/r)			
沙奎那韦 saquinavir/r (SQV/r)			
替普那韦 tipranavir/r (TPV/r)			
奈非那韦 nelfinavir (NFV)			

[0142] 除了耐药分析,网站服务器也会将耐药位点突变的发生情况进行罗列。

[0143] 表2临床实验中可检出的耐药突变类型

NRTIs		NNRTIs		PIs	
M41	L	L100	I	L23	I
K65	R	K101	E,P	L24	I
D67	N,G,E	K103	N,S	D30	N
T69	D,ins	V106	M,A	V32	I
K70	R,E	V179	F	M46	I,L
L74	V,I	Y181	C,I,V	I47	V,A
V75	M,T,A,S	Y188	L,H,C	G48	V,M
F77	L	G190	A,S,E	I50	V,L
Y155	F	P225	H	F53	F,Y
F116	Y	M230	L	I54	V,L,M,A,T,S
Q151	M			G73	S,T,C,A
M184	V,I			L76	V
L210	W			V82	A,T,F,S,C,M,L
T215	Y,F,I,S,C,D,V,E			N83	D
K219	Q,E,N,R			I84	V,A,C
				I85	V
				N88	D,S
				L90	M

[0145] 本实施例还提供一种高效检测人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)耐药基因型的试剂盒,即三段法HIV基因型耐药检测试剂盒。所述试剂盒包括本实施例所述的引物组。

[0146] 对比例1:

[0147] 常规一段法巢式PCR第1轮上游MAW 26:5'-TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC-3'(2028-2050,HXB2),第1轮下游引物RT21:5'-CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG-3'(3509-3539,HXB2);第2轮上游引物PRO-1:5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3'(2147-2166,HXB2),第2轮下游引物RT20:5'-CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC-3'(3441-3462,HXB2)和RT27:5'-CTTCTgTATATCATTgACAgTCCAgCT-3'(3299-3327,HXB2),最终扩增长度为1181bp/1316bp(包含了2147-3327/3462之间的PR1~99和RT20~230氨基酸位点)。实验所用引物组MAW 26、RT21、PRO-1、RT20、RT27进行巢式PCR扩增。第一轮PCR上游引物为MAW 26,下游引物为RT21;反应体系为10*buffer 2.5ul,MgCl₂ 5ul,dNTP 2.5ul,引物MAW 26 0.5ul,引物RT21

0.5ul,RT酶0.5ul,taq酶0.5ul,RNase Inhibitor 0.5ul,ddH₂O 7.5ul,RNA模板5ul。第一轮反应条件为48℃45分钟;94℃2分钟;94℃15秒,50℃20秒,72℃2分钟,40cycles;72℃10分钟。第2轮上游引物为PR0-1,下游引物为RT20/RT-R2,反应体系Mixture 25ul,PR0-1 1ul,RT20 1ul,ddH₂O 18ul,模板(第一轮PCR产物) 5ul。当扩增失败时,使用RT-R2同体积浓度替代RT20进行第2轮扩增以提高扩增率。第2轮反应条件为94℃4分钟;94℃15秒,55℃20秒,72℃2分钟,40cycles;72℃10分钟。实验样本的为HIV-1新发感染者500例,病毒载量范围为低于检测限50-5.7*10⁷copies/ml。实验样本使用这组一段法引物进行扩增并成功测序的成功率为89%,且参考病载,大部分一段法扩增失败的样品其病载载量在10²-10³。使用三段法扩增同一批500例样本,阳性率92.4%。说明普通的in house实验方法中,针对较低病毒载量的实验中,本发明的三段法比常规的一段法有更高的敏感度。

[0148] 对比例2:

[0149] 样本分散时间采集后,为了集中实验而保存时间较长。对这批样本进行再次病毒载量检测,病毒载量与标本新鲜采集时相比并无大的变化,但使用一段法扩增成功率不到10%。由于病毒载量针对100bp左右的更小片段,说明样本的RNA片段不完整有所降解。对使用一段法(一段法参照对比例1描述)进行POL区耐药基因扩增失败的168例样本,使用本发明的三段法进行基因扩增A区(128/168,76.19%),B区(139/168,82.74%),C区(96/168,57.14%)。3个片段都扩增成功为88/168,52.38%。说明本发明的三段法PCR技术灵敏度更高,对RNA片段不完整有所降解的标本有着更高的灵敏度,为数据的完整性提供了强有力的技术支持。

[0150] 本发明HIV-1耐药基因型检测法与现有的一段in-house扩增方法相比,具有更高的灵敏度和特异性。且使用的是常规的巢式PCR技术,具有操作简单、时间短、试剂耗材来源广、成本低、PCR体系试剂通性强等优势,具有较大的应用前景。特别是实践研究工作中,标本分时段采集、集中检测,存放较久导致RNA片段不完整有所降解的标本有着更高的价值和灵敏度与市场化的试剂盒相比,由于引物设计时参考的序列亚型广泛,覆盖了各种亚型/重组型,引物具有更高的特异性和覆盖面。

[0151] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 复旦大学
- [0003] <120> 人类免疫缺陷病毒1型耐药基因型检测法及试剂盒
- [0004] <160> 14
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 29
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] tgaagaytg yactgaragr caggcbaat 29
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] cttctgtcaa tggycaytgb 20
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 20
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] ttaacytccc tcaratcact 20
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 24
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] ttttactggt acagtttyaa trgg 24
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 22
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] agtccyattg aaactgtrcc ag 22
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 20
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0040] <400> 6
[0041] attgctggtg atccyttcca 20
[0042] <210> 7
[0043] <211> 20
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0046] <400> 7
[0047] acaatggcca ttgacararg 20
[0048] <210> 8
[0049] <211> 19
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0052] <400> 8
[0053] ctaggtatgg tgaakgcag 19
[0054] <210> 9
[0055] <211> 20
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0058] <400> 9
[0059] aggaatacca caccngcrg 20
[0060] <210> 10
[0061] <211> 23
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0064] <400> 10
[0065] atccctgcrt aaatygtact tgc 23
[0066] <210> 11
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0070] <400> 11
[0071] tgtggngat gcatwytyt 20
[0072] <210> 12
[0073] <211> 23
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0076] <400> 12
[0077] cttctgtatg tcattgacrg tcc 23

[0078] <210> 13
[0079] <211> 300
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0082] <400> 13
[0083] acctcaratc actctttggc aacgaccctg tgtcacagta aaaatagaag gacagctgag 60
[0084] ggaagctcta ttagatacag gagcagatga tacagtatta gaagagataa atttgccagg 120
[0085] aaaatggaaa ccaaaaatga tagggggaat tggaggtttt atcaaagtaa gacaatatga 180
[0086] tcagataagt atagaaatgt gtggaaaaaa ggctataggt acagtattag taggacctac 240
[0087] acctgtcaac ataattggac gaaatctggt gactcagctt ggttgcaact taaattttcc 300
[0088] <210> 14
[0089] <211> 711
[0090] <212> DNA
[0091] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0092] <400> 14
[0093] aaaaggttaa acaatggcca ttgacagaag aaaaaataaa agcattaaca gaaatttgta 60
[0094] aggagatgga agaggaagga aaaatctcaa aaattgggcc tgaaaacca tataatactc 120
[0095] cagtatttgc tataaagaaa aaggacagca ctaaattggag aaaattagta gatttcaggg 180
[0096] agctcaataa aagaactcaa gatttttggg aagtccaatt aggaataccg catccagcag 240
[0097] gtttaaaaaa gaaaaaatca gtaacagtac tagatgtggg agatgcatat ttttcagtgc 300
[0098] cattagataa agaatttagg aagtatactg cattcaccat acctagtaca aacaatgaga 360
[0099] caccaggaat cagatatcag tacaatgtgc tgccacaagg atggaaagga tcaccagcaa 420
[0100] tattccaagc tagcatgaca aaaatattag agccttttag aataaaaaat ccagaaatag 480
[0101] ttatctatca atacatggat gatttgtatg taggctctga tttagaaata gggcagcaca 540
[0102] gaacaaaaat agaagagcta agagctcatc tattgaaatg gggatttact acaccagaca 600
[0103] aaaagcatca aaaggaacc ccatccttt ggatgggata tgaactccat cctgacaaat 660
[0104] ggacagttca gcctataaaa ctgccagaaa aggatagctg gactgtcaat g 711

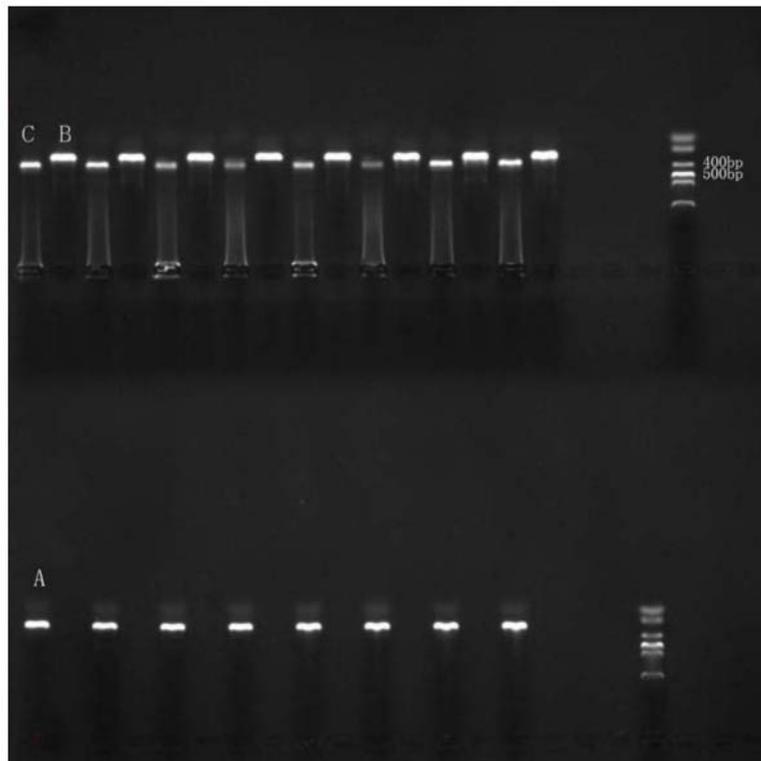


图1

1. HXB2	GGAAATGCGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCAAC;
2. CRF01_AE	GGAAATGTGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGATTGTAAGTAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAGCTCTGGCCTTCCCAC;
3. B	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGATTGTAAGTAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAGATNTGGCCTTCCCAC;
4. C	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGTACAGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATCTGGCCTTCCCAC;
5. CRF07_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGATTGTAAGTAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATCTGGCCTTCCCAC;
6. CRF08_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGACTGTACTGAAAGGCAGGCGAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCCAC;
7. CRF55_01B	GGAAATGTGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCTGAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAGGCTGTGGCCTTCCAAC;
8. CRF57_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGACTGTAAATGAAAGGCAGGCTAATTTTTAGGGAGATTTTGGCCTTCCCAC;
9. CRF62_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGACTGTGCTGAAAGGCAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCCAC;
10. CRF65_cpx	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAGATGAAAGACTGTACTGAAAGGCAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCCAC;
11. CRF79_0107	GGAAATGTGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCTGAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAGACTGTGGCCTTCCAAC;
12. CRF80_0107	GGAAATGTGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCGAGAGACAGGCGAATTTTTAGGGAAACTGTGGCCTTCCAAC;
13. CRF85_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGACTGTACTGAAAGGCAGGCGAATTTTTAGGGAAAATTTTGCCTTCCCAC;
14. CRF86_BC	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGACTGTATTGAAAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCCAC;
15. CRF100_01C	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAAATTTGGCCTTCCAAC;
16. CRF101_01B	GGAAATGTGGAAAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGACTGCACCTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGCAGACTTTGGCCTTCCCAC;

图2

1. HXB2	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT
2. CRF01_AE	GCCAGGAATGGATGGTCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTT
3. B	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTT
4. C	GCCAGGAATGGATGGTCCAAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
5. CRF07_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
6. CRF08_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
7. CRF55_01B	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATCT
8. CRF57_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
9. CRF62_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT
10. CRF65_cpx	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT
11. CRF79_0107	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAAGTGGCCATTAAACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
12. CRF80_0107	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT
13. CRF85_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAGATTT
14. CRF86_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAATGGAAATTT
15. CRF100_01C	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT
16. CRF101_01B	GCCTGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT

图3

1. HXB2	CAGAAAGACAAGGAACATCCTCCTCCTTTAGTTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAGTAI
2. CRF01_AE	CCGATAGACAAGGAGCTATATCCT---TCGGCTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTAGTCACAATAI
3. B	CCAACAGACAAGGAACCTGTATCCT---TTAGCTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTAGTCACAATAI
4. C	CCGAAAGACAGGGAA-----CCC---TTAACTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTACAATAI
5. CRF07_BC	CCAATAGACAAGGAACCTATATCCT---TTAACTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAI
6. CRF08_BC	CCGAAAGACAGGGAA-----CCC---TTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCTCAATAI
7. CRF55_01B	CAGAAAGACAAGGGACATCGCCCTCCTGTAGTTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAATAI
8. CRF57_BC	CCGAAAGACAGGGAA-----CCT---TTAACTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTCTCAATAI
9. CRF62_BC	TCGAAAGACAGGGAA-----CCT---TTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCCAATAI
10. CRF65_cpx	CCGAAAGACAGGGAA-----CCC---TTAACTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTCTCAATAI
11. CRF79_0107	CAGAAAGACAAGGAACCTCCTCCTCCTTTCAGTTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCGTTGTACAGTAI
12. CRF80_0107	CAGAAAGACAAGGACCATCCTCCTCCTTTAGTTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAGTAI
13. CRF85_BC	CCGAAAGACAGGGAA-----CCC---TTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTCTCAATAI
14. CRF86_BC	CAGAAAGACAAGGGAG-----CCC---TTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTTGTACAATAI
15. CRF100_01C	CAGAAAGAT-----CATCCTCCTCCTTCAAATTTTCCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAGTAI
16. CRF101_01B	CAGAAAGACAAGAACCTTTATCCCCCTTTTGTTCCTCAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTACAGTAI

图4

1. HXB2	GGTTGTACTTTAAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGACCAAAG
2. CRF01_AE	GGTTGTACTTTAAATTTTCCCATTAGCCCTATTAAAAGTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGTCCAAAAG
3. B	GGCTGCACITTTAAATTTTCCCTATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
4. C	GGATGTACACTAAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGTCCAAAAG
5. CRF07_BC	GGTTGCACITTTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
6. CRF08_BC	GGATGCACACTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
7. CRF55_01B	GGTTGTACTTTAAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
8. CRF57_BC	GGTTGCACITTTAAATTTTCCCATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
9. CRF62_BC	GGGTGCACACTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAAGTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
10. CRF65_cpx	GGATGTACACTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAAGTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
11. CRF79_0107	GGTTGTACTTTAAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
12. CRF80_0107	GGTTGTACTTTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
13. CRF85_BC	GGTTGCACITTTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
14. CRF86_BC	GGGTGCACACTAAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAG
15. CRF100_01C	GGCTGTACTTTGAATTTTCCAATTAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGACCAAAG
16. CRF101_01B	GGTTGTACTTTAAATTTTCCAATCAGTCCCTATTGAACTGTACCAGTAAACTTTAAAGCCAGGAATGGATGGACCAAAG

图5

1. HXB2	ATTGGTTGTACTTTAAATTTCCCAATTAGTCCCTATTGACACTGTACCAGTAAACATTAAGCCAGGAATGGATGGACC.
2. CRF01_AE	ATTGGTTGTACTTTAAATTTTCCCAATTAGGCCCTATTAAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGTCC.
3. B	CTTGGCTGCACCTTTAAATTTTCCCTATTAGTCCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
4. C	CTTGGATGTACACTAAATTTTCCCAATTAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGTCC.
5. CRF07_BC	CTTGGTTGCACCTTTAAATTTTCCCAATCAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
6. CRF08_BC	CTTGGATGCACACTAAATTTTCCCAATCAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
7. CRF55_01B	ATTGGTTGTACTTTAAATTTTCCCAATTAGTCCCTATTGACACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
8. CRF57_BC	CTTGGTTGCACCTTTAAATTTTCCCAATTAGTCCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
9. CRF62_BC	CTTGGGTGCACACTAAATTTTCCCAATCAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAGTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
10. CRF65_cpx	CTTGGATGTACACTAAATTTTCCCAATCAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAGTTAAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
11. CRF79_0107	ATTGGTTGTACTTTAAATTTTCCCAATTAGTCCCTATTGACACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGACC.
12. CRF80_0107	CTTGGTTGTACTTTAAATTTTCCCAATCAGTCCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
13. CRF85_BC	CTTGGTTGCACCTTTAAATTTTCCCAATCAGTCCCAATTGAAACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
14. CRF86_BC	CTTGGGTGCACACTAAATTTTCCCAATTAGTCCCAATTGACACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCC.
15. CRF100_01C	ATTGGCTGTACTTTGAATTTCCCAATTAGTCCCTATTGACACTGTACCAGTAAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGACC.
16. CRF101_01B	ATTGGTTGTACTCTAAATTTCCCAATCAGTCCCTATTGACACTGTACCAGTATCATTAAAGCCAGGAATGGATGGACC.

图6

1. HXB2	TATCAGTACAATGTGCTGCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAAAAATCTT;
2. CRF01_AE	TATCAGTACAATGTGCTGCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATTTT;
3. B	TATCAGTATAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTT;
4. C	TATCAATACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAAAGATCCT;
5. CRF07_BC	TATCAGTACAATGTACTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACTAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAACCTT;
6. CRF08_BC	TATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAATGTAGCATGACAAAAATCTT;
7. CRF55_01B	TATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTT;
8. CRF57_BC	TACCAATATAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTT;
9. CRF62_BC	TATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAATGTAGTATGACAAAAATCTT;
10. CRF65_cpx	TATCAATACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAATGTAGCATGACAAAAATCTT;
11. CRF79_0107	TATCAGTACAATGTGCTGCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAGTATAGCATGACAAAGATCTT;
12. CRF80_0107	TATCAGTACAATGTACTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTT;
13. CRF85_BC	TATCAGTATAATGTACTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTT;
14. CRF86_BC	TATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAATGTAGCATGACAAAAATCTT;
15. CRF100_01C	TATCAGTACAATGTGCTGCCACAGGGATGGAAAAGGATCGCCAGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAAAAATCTT;
16. CRF101_01B	TATCAGTACAATGTGCTTACCACAGGGATGGAAAAGGATCACCCAGCAATATTCCAGAGTAGCATGACAAAAATCTT;

图7

1. HXB2	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT;
2. CRF01_AE	GCCAGGAATGGATGGTCCAAAAGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTT;
3. B	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTT;
4. C	GCCAGGAATGGATGGTCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
5. CRF07_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
6. CRF08_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
7. CRF55_01B	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATCT;
8. CRF57_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGACCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
9. CRF62_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAAGAAATTT;
10. CRF65_cpx	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT;
11. CRF79_0107	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTAAACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
12. CRF80_0107	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGCAATTT;
13. CRF85_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAGATTT;
14. CRF86_BC	GCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGGTTAAACAAATGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAATGGAAATTT;
15. CRF100_01C	GCCAGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAAAAATTT;
16. CRF101_01B	GCCTGGAATGGATGGACCAAAGGTTAAACAGTGGCCATTGACAGAAAGAAAAATAAAAGCATTAAACAGAAATTT;

图8

1. HXB2	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTGGGGAGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTTAGAAI
2. CRF01_AE	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTGGGGAGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTTAGAAI
3. B	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGACGTGGGGTGTGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATAAAGACTTCAGGAI
4. C	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGGGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTCAGGAI
5. CRF07_BC	AAAGAAAAAATCAGTGACAGTACTGGATGTGGGGGATGCATATTTTT	CAATTCCTTTATATGAAAGACTTCAGGAI
6. CRF08_BC	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTCTGGATGTGGGGTGTGCATATTTCT	CAGTTCCTTTAGATAAAGACTTCAGGAI
7. CRF55_01B	AAGGAAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTAGGGAGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAAGTTTTAGAAI
8. CRF57_BC	AAAGAAAAAATCAGTGTCTAGTACTGGATGTGGGGGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTATATGAAAGACTTCAGGAI
9. CRF62_BC	AAAGAAAAAATCTGTGACAGTGTGGATGTGGGGGATGCATATTTCT	CAGTTCCTTTAGATAAAGATTTTAGAAI
10. CRF65_cpx	AGAGAGAAAAATCAGTGACAGTACTGGATGTGGGGGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTATATGAAAGACTTTAGAAI
11. CRF79_0107	GAGAAAGAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGGAGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAGCTTTAGAAI
12. CRF80_0107	AAAGAAAAAATCAGTGACAGTGTGGATGTGGGGGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTTATATGAAAGACTTCAGGAI
13. CRF85_BC	AAAGAAAAAATCAGTGACAGTACTAGATGTGGGGGATGCTTATTTTT	CAGTTCCTTTAGATAAAGACTTCAGGAI
14. CRF86_BC	AAAGAACAAATCAGTAACAGTCTGGATGTGGGGTGTGCATATTTCT	CAGTTCCTTTAGATAAAGAAATTCAGGAI
15. CRF100_01C	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTAGATGTGGGGAGATGCATATTTTT	CAGTTCCTTAGATGAAAGCTTTAGAAI
16. CRF101_01B	AAAGAAAAAATCAGTAACAGTATTAGATGTGGGGAGATGCATTTTTTT	CAGTTCCTTTAGATGAAAACITTAGAAI

图12

1. HXB2	CTATAGAACTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAACCTAAATGGGCCAAG'
2. CRF01_AE	CTATAGAACTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACCGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAACCTAAATGGGCCAAG'
3. B	CTATAGTGCTGCCAGAAAAAGACCACTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAATGGGCCAAG'
4. C	CTATACAGCTCCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAG	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
5. CRF07_BC	CTACACAGCTGCCAGAAAAAGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAG	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
6. CRF08_BC	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
7. CRF55_01B	CTATAGCGCTGCCAGAAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAG	TAGTGGGAAAATTAATGGGCCAAG'
8. CRF57_BC	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
9. CRF62_BC	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
10. CRF65_cpx	CTATACAGCTGCCGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
11. CRF79_0107	CTATAGAACTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAACCTCAATGGGCCAAG'
12. CRF80_0107	CTATACAGCTGCCAGTACAAGATAGTTGGACTGTCAATGATATACAAAAG	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
13. CRF85_BC	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
14. CRF86_BC	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAAAAG	TAGTGGGAAAATTAACCTGGGCCAAG'
15. CRF100_01C	CTATACAGCTGCCAGAAAAAGGATAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTGGGTAATTAACCTGGGCCAAG'
16. CRF101_01B	CTATAGAACTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGATATACAGAAAT	TAGTAGGAAAACCTAAATGGGCCAAG'

图13

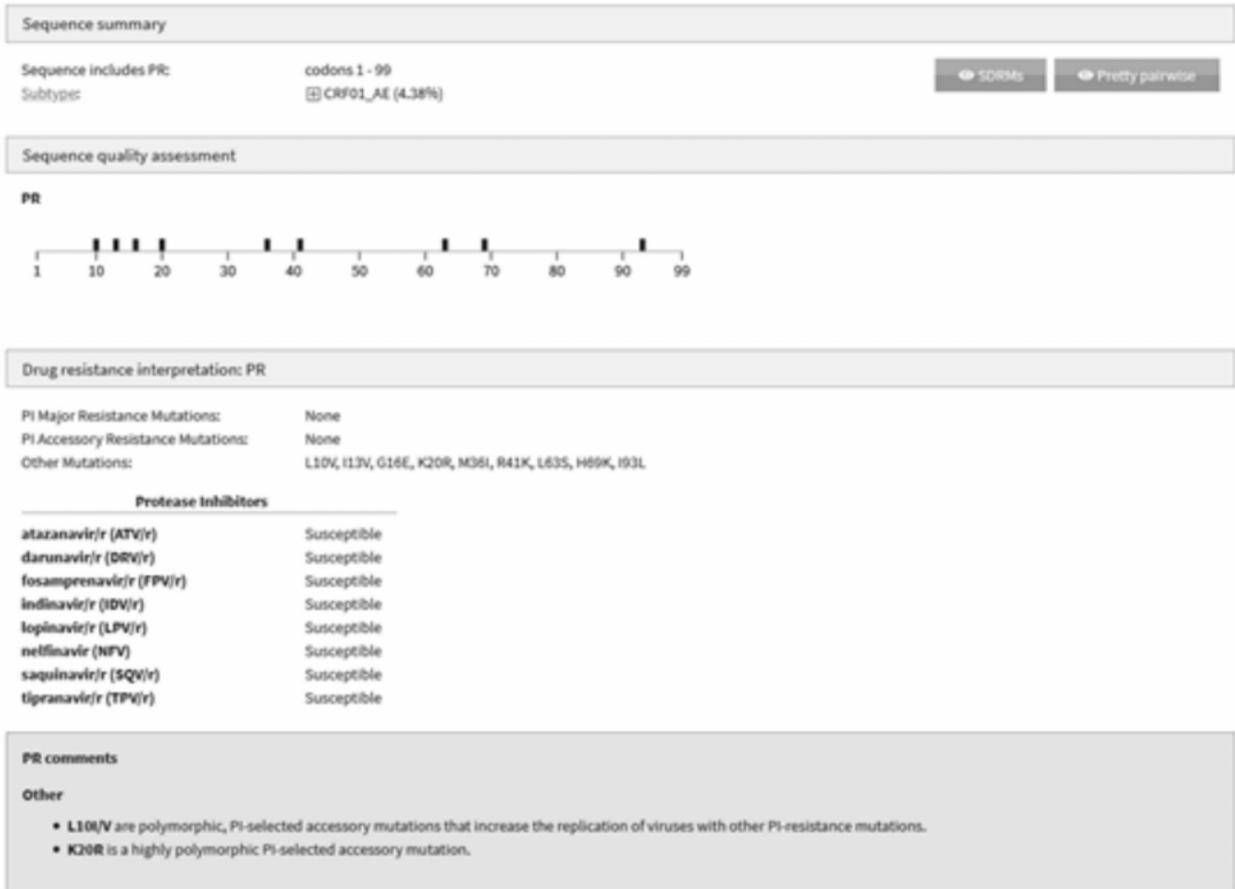


图14

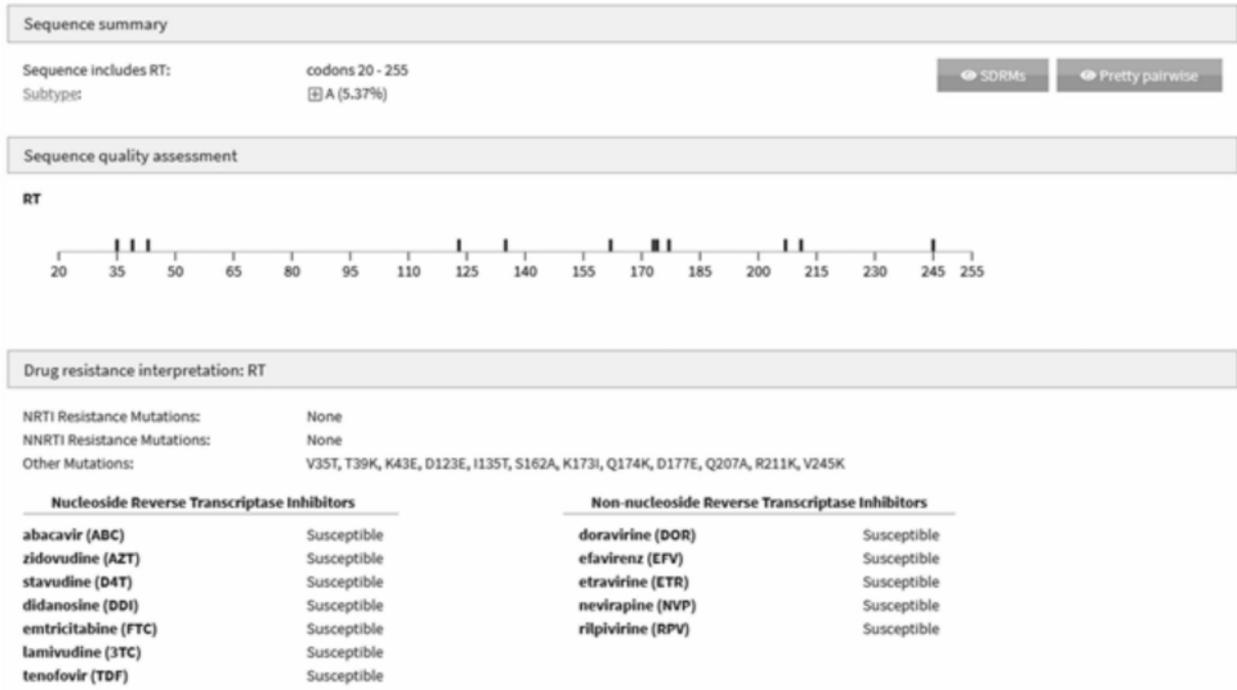


图15