



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111826459 B

(45) 授权公告日 2022.04.05

(21) 申请号 202010673672.4

C12Q 1/686 (2018.01)

(22) 申请日 2020.07.14

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111826459 A

(56) 对比文件

CN 105039560 A, 2015.11.11

CN 104593502 A, 2015.05.06

(43) 申请公布日 2020.10.27

(73) 专利权人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区郿城路3号

审查员 周怡婷

(72) 发明人 梁晓飞 孟亚楠 郭云忠 朱明旗
孙广宇

(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216

代理人 史玫

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表8页 附图3页

(54) 发明名称

果生炭疽菌特异性基因序列及其应用

(57) 摘要

本发明公开了果生炭疽菌特异性基因序列及其应用。本发明基于果生炭疽菌及其近缘物种的全基因组比对获得果生炭疽菌特异性基因序列,进一步利用特异性基因序列设计PCR扩增引物对果生炭疽菌进行检测,并开发相关试剂盒。本发明可特异检测果生炭疽菌(*C.fructicola*),将其与隐秘炭疽菌(*C.aenigma*)、暹罗炭疽菌(*C.siamense*)、香蕉炭疽菌(*C.musae*)等近缘物种区分;具有快速、简便、准确的优点。

1. 一种果生炭疽菌的特异性引物,其特征在于,包括引物P1-F和引物P1-R,所述引物P1-F的序列如SEQ ID No.2所示,所述引物P1-R的序列如SEQ ID No.3所示。
2. 权利要求1所述特异性引物在检测果生炭疽菌中的应用。
3. 权利要求2所述的应用,其特征在于,包括:
 - (1) 从待测菌株材料中提取基因组DNA;
 - (2) 以待测菌株的基因组DNA为模板,用权利要求1所述特异性引物进行PCR扩增;
 - (3) 通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,根据扩增结果判断菌株是否属于果生炭疽菌。
4. 权利要求1所述特异性引物用于制备果生炭疽菌检测试剂盒的应用。
5. 一种果生炭疽菌检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括PCR试剂和权利要求1所述特异性引物。

果生炭疽菌特异性基因序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物病原生物检测技术,特别涉及一种果生炭疽菌特异性基因序列及其应用。

背景技术

[0002] 果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)是属于胶孢炭疽复合群下的一个病原种,在全球广泛分布,能侵染危害牛油果、可可、芒果、梨、苹果、草莓、茶、烟草等几十种植物,是非常重要的植物病原菌。果生炭疽菌也能作为内生菌与植物共生,不引起明显的病害症状。目前,果生炭疽菌的物种鉴定严格依赖于多基因系统发育,需要扩增获得核糖体DNA基因转录间隔区(intergenic spacer region,ITS)、肌动蛋白(Actin)、 β -微管蛋白(β -Tubulin)、甘油三磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GADPH)、钙调蛋白(Calmodium,CAL)、几丁质合成酶(Chitin synthase,CHS-1)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase,GS)、超氧化物歧化酶2(Manganese-superoxide dismutase,SOD2)等多个基因的DNA序列。

[0003] 果生炭疽菌的近缘物种数量较多,这些近缘物种间亲缘关系较近且形态特征差异不明显。多基因系统发育分析是目前鉴定果生炭疽菌物种的唯一手段。运用该技术进行物种鉴定,需要对待检菌株的6-7个靶基因进行PCR扩增,再对获得的目标DNA片段进行测序,然后与公共数据库参比菌株进行序列比对,最后构建系统发育树并进行结果判定。该技术手段虽然结果可靠,但步骤繁琐,费时费力,且对仪器设备和分析人员的专业背景要求较高。

发明内容

[0004] 针对现有技术的缺陷或不足,本发明的目的是提供一种果生炭疽菌特异性基因序列。

[0005] 为此,本发明所提供的序列为SEQ ID No.1所示序列。该序列特异存在于果生炭疽菌株基因组,且在菌株间高度保守,但不存在于隐秘炭疽菌(*C. aenigma*)、暹罗炭疽菌(*C. siamense*)等邻近物种的基因组。

[0006] 进一步,本发明还提供了根据上述基因序列设计的PCR扩增引物。

[0007] 具体的,包括引物P1-F和引物P1-R,所述引物P1-F的序列如SEQ ID No.2所示,所述引物P1-R的序列如SEQ ID No.3所示。

[0008] 同时,本发明还提供了上述引物检测果生炭疽菌的应用。

[0009] 具体的,所述应用方法包括:

[0010] (1) 从待测菌株材料中提取基因组DNA;

[0011] (2) 以待测菌株的基因组DNA为模板,用引物P1-F和P1-R进行PCR扩增;

[0012] (3) 通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,根据扩增结果判断菌株是否属于果生炭疽菌。

[0013] 更进一步,本发明提供了上述引物用于制备果生炭疽菌检测试剂盒的应用。

[0014] 另一方面,本发明又提供了一种果生炭疽菌检测试剂盒。为此,所提供的试剂盒包括PCR试剂和上述引物。

[0015] 相对于现有技术,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0016] (1) 本发明提供一个果生炭疽菌物种特有的核苷酸序列,可为开发适用于物种快速检测鉴定的PCR、LAMP分子标记和试剂盒提供重要便利;

[0017] (2) 本发明开发的PCR引物组适用于果生炭疽菌快速检测,特异性强,重复性好,有效弥补了炭疽形态鉴定方法准确性不足的缺点;

[0018] (3) 本发明鉴定步骤简单快速,成本低廉,无需对多个基因位点进行PCR扩增、测序和系统发育分析,利于推广;

[0019] (4) 本发明可应用于农业科研中的微生物种质资源鉴定、物种多样性研究、出入境检验检疫等方面,可为微生物种质资源保护,进境有害生物检测提供重要依据。

附图说明

[0020] 图1为基因组比对鉴定到的果生炭疽菌物种特异区域;A图展示在该物种特异区域附近,以果生炭疽菌1104-7基因组为参照,其它菌株Illumina二代测序短序列(reads)的比对结果,果生炭疽菌物种特异区域以虚线标注,蓝色道(1),1104-7菌株;绿色道(2-17),其它果生炭疽菌株;黄色道(18-25),果生炭疽邻近物种菌株(18:隐秘炭疽;19-24:暹罗炭疽;25:胶孢炭疽),红色道(26),预测基因;B图展示果生炭疽菌株1104-7和隐秘炭疽菌株XY15在果生炭疽菌物种特异区域处的序列对位示意图。

[0021] 图2为PCR引物组P1-F和P1-R引物能特异检测果生炭疽菌;图示以果生炭疽菌(*C. fructicola*)、隐秘炭疽菌(*C. aenigma*)、香蕉炭疽菌(*C. musae*)、暹罗炭疽菌(*C. siamense*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)等物种菌株基因组DNA为模板,用P1-F/P1-R引物组进行PCR扩增,扩增产物的PCR电泳结果;1-6:果生炭疽菌;7-9:隐秘炭疽菌;10-13:香蕉炭疽菌;14-16:暹罗炭疽菌;17:胶孢炭疽菌;18:阴性对照(NTC)。

[0022] 图3为果生炭疽菌快速检测鉴定试剂盒的准确性评估;图A展示基于PCR扩增对8株苹果炭疽病菌的筛选检测结果,Wq_01呈阳性反应,其余呈阴性反应;图B展示对8株菌的系统发育分析,Wq_01鉴定为果生炭疽,其余7株菌分别鉴定为隐秘炭疽菌和暹罗炭疽菌。

具体实施方式

[0023] 本发明提供一种基于果生炭疽菌特异序列的快速物种核酸检测方法。以下结合附图和实例,对本发明的具体实施方式作进一步描述。

[0024] 以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如Sambrook等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2001)。

[0025] 以下实施例所用序列或生物材料均来自公众可获取的渠道,如GenBank公共数据库、中国农业微生物菌种保藏管理中心、西北农林科技大学等。

[0026] 实施例1:

[0027] 本发明的果生炭疽菌物种特异性DNA序列长19878bp,其序列如SEQ ID No.1所示,

其获取鉴定方法说明如下：

[0028] (1) 选取GenBank公共数据库中20余个子囊菌基因组,对其全基因组编码蛋白进行OrthoMCL聚类,从中筛选出果生炭疽物种特异的OrthoMCL 聚类簇;

[0029] (2) 依托西北农林科技大学真菌研究室前期测序获得的胶孢炭疽组学资源(17个果生炭疽菌株基因组和8个果生炭疽菌近缘种基因组),对获得的果生炭疽特异OrthoMCL聚类簇做tBlastn分析和基因组比对分析,验证基因的果生炭疽物种特异性和果生炭疽种内菌株间保守性;

[0030] (3) 在步骤(1)和(2)基因组比对基础上,进一步通过GenBank数据库的Blast比对和手动筛选,获得果生炭疽菌物种特异DNA,如图1所示,目标序列具有如下特征:

[0031] (3.1) 序列有高度的果生炭疽物种特异性;该序列仅存在于果生炭疽菌,而不存在于隐秘炭疽、暹罗炭疽、胶孢炭疽等果生炭疽菌的近缘种;另外,对GenBank公共数据库进行检索,果生炭疽种外亦未发现该序列;

[0032] (3.2) 序列在果生炭疽种内高度保守;分析17个果生炭疽菌株的基因组,发现所有菌株基因组均含有该序列,其DNA序列相似性高于99%;

[0033] (3.3) 序列进化特征清楚;比较基因组分析表明,该物种特异区域的形成是由于外源DNA插入基因组保守区域所致,物种特异区域两侧的DNA序列在近缘物种间高度保守,物种特异区域内含8个物种特异基因。

[0034] 图1A显示果生炭疽菌物种特异DNA序列的种间特异性和种内保守性,图1B显示果生炭疽菌物种特异DNA序列位点的DNA插入事件。

[0035] 所得如SEQ ID No.1所示DNA序列是果生炭疽菌特有序列,而且在果生炭疽种内高度保守,适宜于物种快速鉴定标记的开发。

[0036] 进一步,本发明以基因簇上的一个酯酶基因(图1B,CF4-4)为靶序列,设计扩增引物组P1-F和P1-R,其序列为:

[0037] P1-F:5' CTTGATGGGTGCGTCTGGAAA 3'

[0038] P1-R:5' GGCAACATCGCCGTAGTCATT 3'。

[0039] 基于上述特异性扩增引物组P1-F、P1-R,制作果生炭疽菌(*C.fructicola*)快速鉴定的核酸测试剂盒。试剂盒中所用PCR试剂一般包括Taq DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶缓冲液、dNTPs等,均可采用市售产品获得。

[0040] 实施例2:

[0041] 该实施例为果生炭疽菌物种快速检测试剂盒的开发示例,该实施例的试剂盒包括常规PCR试剂(北京全式金生物技术有限公司的商业化试剂盒 AP111)、序列为SEQ ID No.2的引物P1-F、序列为SEQ ID No.3的引物P1-R。

[0042] 运用试剂盒进行果生炭疽菌快速检测的具体步骤如下:

[0043] (1) 提取供试菌株的基因组DNA;

[0044] (2) DNA扩增:PCR扩增体系为:10xEasy Taq Buffer 2.5 μ L,2.5mM dNTPs 2 μ L,10 μ M正向引物(SEQ ID NO.2) 0.5 μ L,10 μ M反向引物(SEQ ID NO.2) 0.5 μ L,100ng/ μ L DNA模板 1.0 μ L,Easy Taq DNA聚合酶0.2 μ L,ddH₂O补齐至25 μ L。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性2min;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火 30s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min;

[0045] (3) DNA检测:对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,对果生炭疽菌菌株扩增预期

获得431bp的电泳条带,非果生炭疽菌的PCR扩增结果则呈阴性。

[0046] 实施例3:

[0047] 本实施例展示果生炭疽菌物种快速检测试剂盒对果生炭疽菌 (*C. fructicola*)、隐秘炭疽菌 (*C. aenigma*)、香蕉炭疽菌 (*C. musae*)、暹罗炭疽菌 (*C. siamense*)、胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 等物种的PCR扩增检测结果。具体如下:

[0048] 供试菌株:本实施例共采用17株供试菌株,包括6个果生炭疽菌、3个隐秘炭疽菌、4个香蕉炭疽菌、3个暹罗炭疽菌、1个胶孢炭疽菌。所有菌株均保存于中国农业微生物菌种保藏管理中心或西北农林科技大学真菌研究室,菌株的物种分类信息均基于多基因系统发育分析确认,菌株具体信息如表1所示:

[0049] 表1实施例3供试菌株信息表

[0050]

序号	菌株名称	菌株编号
1	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LC0510
2	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LZLQ01
3	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LC0146
4	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LC3680
5	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LC0876
6	<i>Colletotrichum fructicola</i>	LC0033
7	<i>Colletotrichum aenigma</i>	WH032-1
8	<i>Colletotrichum aenigma</i>	WH031-1
9	<i>Colletotrichum aenigma</i>	PGYSQ017-2
10	<i>Colletotrichum musae</i>	31244
11	<i>Colletotrichum musae</i>	31257
12	<i>Colletotrichum musae</i>	31267
13	<i>Colletotrichum musae</i>	LC0084
14	<i>Colletotrichum siamense</i>	LC0037
15	<i>Colletotrichum siamense</i>	LC0034
16	<i>Colletotrichum siamense</i>	LC0043
17	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	QX17

[0051] 供试菌株的PCR扩增检测:按前述实施例的步骤提取17个供试菌株的DNA,运用果生炭疽菌物种快速检测试剂盒进行PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果如图2所示,由图可知,6个果生炭疽菌株能特异扩增产生431bp的目标条带,而其余11个近缘物种菌株(3个隐秘炭疽菌、4个香蕉炭疽菌、3个暹罗炭疽菌、1个胶孢炭疽菌)均不产生条带,该结果表明,试剂盒能够特异扩增果生炭疽菌,有效区分果生炭疽菌及其近缘种,适用于果生炭疽菌的快速检测。

[0052] 实施例4:

[0053] 本实施例为本发明果生炭疽菌物种快速检测试剂盒在植物病原生物学研究中的一个运用场景。

[0054] 炭疽叶枯病(*Glomerella* Leaf Spot)是蔷薇科植物上的一个重要叶部病害,危害苹果、梨、草莓等作物,其病原种类多样,包括果生炭疽菌、隐秘炭疽菌、松针炭疽菌等多

种病原种。在苹果上,炭疽叶枯病主要危害金冠、乔纳金等金冠系品种。本实施例围绕澳洲青苹品种上新发现的炭疽叶枯病,基于试剂盒筛选,快速证实果生炭疽菌是引致新病害的一个病原物。具体实施步骤如下:

[0055] (1) 菌株的分离纯化:在陕西杨凌和岐山发病果园采集有炭疽叶枯病状的苹果病叶,实验室内保湿培养待其产孢,用挑针直接挑取分生孢子堆上的分生孢子,接种到PDA培养基上,对长出的菌落进行单孢纯化获得纯培养物。共获得8个纯菌株,菌株信息如表2所示:

[0056] 表2澳洲青苹炭疽叶枯病斑分离供试菌株信息表

[0057]

序号	菌株编号	分离地与分离部位
1	Tj_01	杨陵区五泉镇、病叶
2	Tj_02	杨陵区五泉镇、病叶
3	Tj_04	杨陵区五泉镇、病果
4	Wq_01	杨陵区五泉镇、病叶
5	Qs_G1	岐山县、病叶
6	Qs_G2	岐山县、病叶
7	Qs_Y1	岐山县、病果
8	Qs_Y2	岐山县、病果

[0058] (2) 供试菌株的PCR筛选:基于果生炭疽菌物种快速检测试剂盒,对8个纯菌株进行PCR筛选,结果如图3A所示,其中1个菌株(Wq_01)呈阳性扩增结果,其余7个菌株均呈阴性。

[0059] (3) 多基因系统发育分析:按多基因系统发育分析的流程对8个菌株进行物种鉴定,PCR扩增肌动蛋白(Actin)、 β -微管蛋白(β -Tubulin)、甘油三磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GADPH)、钙调蛋白(Calmodium,CAL)、几丁质合成酶(Chitin synthase,CHS-1)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase,GS)、超氧化物歧化酶2(Manganese-superoxide dismutase,SOD2)等基因的DNA序列,对扩增产物进行测序;然后,下载公共数据库的参比菌株序列信息,整合测序序列进行多重序列对位和多基因系统发育树构建,其结果如图3B所示,由图可知,试剂盒筛选鉴定到的Wq_01菌株,系统发育分析鉴定为果生炭疽菌,而其余七个阴性菌株中,Qs_G1、Qs_G2、Qs_Y1、Qs_Y2鉴定为隐秘炭疽菌;Tj_01、Tj_02和Tj_04鉴定为暹罗炭疽菌。这一结果表明本试剂盒能快速准确的鉴定到果生炭疽菌。

[0060] 对比例1:快速检测试剂盒与多基因系统发育分析的流程比较

[0061] 本对比例旨在结合实施例3,说明相比于多基因系统发育分析,果生炭疽菌物种快速检测试剂盒有明显的效率和成本优势。

[0062] 如仍拟明确果生炭疽菌是否是引起澳洲青苹炭疽叶枯病的病原,以分离获取的8个纯菌株为例,则多基因系统发育分析流程所需的步骤如下:

[0063] (1) Marker基因的PCR扩增与Sanger测序:按多基因系统发育分析惯例,每个菌株需扩增Actin、 β -Tubulin、GADPH、CAL、CHS-1、GS、SOD2七个基因,并均进行测序,获得的DNA序列,进行人工校验和错误碱基去除,获得高质量无误序列;

[0064] (2) 多基因系统发育分析:①对每一个Marker基因,下载公共数据库中参比菌株

的DNA序列,加入8个纯菌株序列,运用对位软件(如MEGA7.0)进行多重序列比对分析;②人工分析校验比对结果,并进行对位序列的串联,获得多基因对位文件;③运用系统发育分析软件(如MEGA7.0),基于多基因对位文件构建系统发育树;④分析系统发育树上菌株的聚类结果,结合关键分支位点的统计支持率判定菌株的物种分类地位;

[0065] (3) 根据物种鉴定结果,确定8个纯菌株中是否包含果生炭疽菌;

[0066] (4) 表3展示本对比例中快速检测试剂盒与多基因系统分析的效率与成本差异。相比于多基因系统发育分析,果生炭疽菌物种快速检测试剂盒在时间、经济成本、便捷度等方面有明显的优势。

[0067] 表3快速检测试剂盒与多基因系统分析的效率与成本差异比较

	果生炭疽菌物种快速检测试剂盒	多基因系统发育分析
PCR 反应	1 个/菌株	7 个/菌株
PCR 产物测序	0 个/菌株	7 个/菌株
检测供试 DNA 所花费时间	3-4 个小时	2 天
[0068] 检测供试 DNA 所需成本估算	1 元/菌株 ^a	147 元/菌株 ^b
检测便捷度	琼脂糖凝胶电泳检测, 直观	依赖于专业软件进行多基因系统发育分析, 相对复杂

[0069] ^a成本估算说明:PCR试剂盒成本按北京全式金生物技术有限公司的商业化试剂盒AP111-01核算,每个PCR反应成本0.6元,加耗材、琼脂糖凝胶电泳检测费用,共1.0元/菌株。

[0070] ^b成本估算说明:PCR反应成本按1.0元/个估算,PCR产物测序成本按20元/个估算。每个菌株需扩增7个marker基因,并进行产物测序,因此总成本为 $(1+20) \times 7=147$ 元/菌株。

[0071] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>西北农林科技大学
- [0003] <120>果生炭疽菌特异性基因序列及其应用
- [0004] <210>1
- [0005] <211>19878
- [0006] <212>DNA
- [0007] <213>
- [0008] <220>果生炭疽菌特异性基因序列
- [0009] <400>1
- [0010] TCACTGAGTCGTTCTGACTACGGCTTCTCTGAAAAATATTTGATGGCAATTGAAAAATACGAATCAAAAT
GGTTTCGCATATCTAGCGTCTGAGACTTGGTGGAGTGATCCAATATTGCGATACGCTGGGAACGACATCTCCACACG
TCAACAAGAGACTGACTACGCACAGCCGAAACTACCGTTAAAGAGAGACTTTCCCTTGTCATTTACACGAAATGAG
CGAACAATAGGAATTGATACGACTAGATTGATACCTAAAAATATCGAAATTTGATCGTTCGCGTCGAAACTACCTTAC
TTAACTATCGAATGCACATTACTCTAATCAATTAACATGATAATAGCACAATATGATTAATGCCATTCCAATTGGT
AAAACCTGGAGTAACACTGACATCAATCATAAAATATAACGTTTGTGGACCTTGGTACACTCTCTTTGAGTAACAG
AACCAGTTGAGCATTCCAGCGACGAAAAACACCACCACACTACGCAAGCGTAGTCTGCAAATATGTCAGCACCTCA
CGGCGATGGAAAATGTCAAGCCTTGGAGGGCTTACTGAAAGTTGCTGCTATCCACGCTGCGGGAGCCAGGCAGCAGGA
AGAAAGTTGATGTGACCACCGTGAATGACAGCGTTACACAATTCGCAACCCAACCAACCCAGCTGGGAGGATGAAAG
GTTTCGAGAGCAAGGGAGAGCCTTCTCACTGCGGCGAAGCCAGATAATAAAGAAAGTAGGAAATGCGATTGTAAGTTG
CTGTAGGATGACTGTCACACTAACGATTGAGTTGAAAGCTGCGCCTGACGTTAGACTTTCCAATGATGTTGACGTAT
GAAGAGTTGGTGACATTTAACTTGTGTGAGAACAGATTGATACATCCAATAAGAAACAGCACACAATACCCAGGA
TAAGAGAGTTGACTGGTACGTTGAGCGACTCGTTGATCTGCGACAGATGTTTCCACAAAGGCAACCCGCCGTCTTTC
CCGAGACTCCACGTCATCATGGAGGCGACTTGAGCGCAGCCGACGCTTCCAATAGGCAGAAGAACAATCGTCACCAA
CGTGAAAATTACGGGCACCAAATCTCCTGACGAAACCTGTTGCCAGATGGTGTAAGGGGAAAGTTGGACGTATTGG
CAAGGACGGCGGGATAGTCGGTGATGCAGTACAACGTCGCTAGGAGAAAGGCAAGAGAGGTGACAAAAGATATGACG
GAGGCTATTATGATGGTGCGAGGGACCACGTGTCGAGCGTTTTTACTTCTTCAACTAGGTGTACAGCGCCATCAAT
GGGACAAAATGCCACCACAGGTGCCGTGAGGCGATGAGAACTGGACGCCCGCAGACCAGCCGGATTCTTGGGTAT
ACTCGGTCCACACCACAGAGGAGGGCTGCTTGGTCTTCTGCATCACCAGCGTGGTGATTAAGAAGGTGAAGAATGCC
CCTAGACTTAGAAAAGACTGTGTTGTTTCAGAAAAGGTGAGATACGATCGATACCGAAGCATGTGTGGACTTACATCCG
CCAGTATAGAATAGTGAGAAGAGTCTTTTCCCGCATAGATTAAAGAGACAAACCAATAGATTGACACCCTGAAAGCA
AAGAAACGGCATCCAAGAGCTCTGAGAAAAGTTCGGGTTCCAATGCAAAATGAGGGCGTGGATGCAAGGCCAAACAG
CGCTCGTGCTGGAAGCAGACATGGCAATCCACGAGAACCAGCTCAGGAACCCACAAATGTAGCTCTGATATATGCGA
TCAGCAAGGAAGGCATCTGCAAATGCACGAGTCCAGACCCACCGTCAAATTGTTTACAGCCTTCGGTGCCAAGATCG
AAGTCCAATGATACTGTCCACCATTTGTCGGATACGCAGAAACCAATTCGCAAGTGTGATACTAATGCAGCTGAAG
ATAGTCGTGACTATAATCACACCCAGGCTGTAAGTGCAGGGCCATACCAATCGAGATGGTGAGAGTGACTGCGAC
GACGAGCCAGCTGTTACTGACGTTGAAGCCCGCTGAGAGAATCCCGAGCCAATTCAGATCTTTGCGAAATGAGTTGT
CGACTAGGATTCCATCATGGACTGAGGATGAACGAGCAATGCCATCATGCGGGACTGATTGGATGATCTTGTAGAA
AGTCTTCGGGGGGGGGATTAATAAAAGGATATGCTACCGTCTGATGAACCGCCGAGCCCTTTGTCTTGAGTGTACTG

AATTTCTCACTTCCGTCGATTTCCATGATTTCGGCAGAGATTGTATAAAAATAAGAATGGTGAAAATACGCAACCTTCC
CAAGACCACATGCGTCAGGGCCTGGCAGCAAGACATTGGAAGGCGCTGCTAGGCTTATATCAATGCTGGAACCTAGC
TTGAGTTACACACCTAGGGCTTTGATCTTCGGAAACTCGGAAAGCTCTTATCAGCTGGAGGGGATGGCTATCTAGCG
CGCATTAGCCCCAAAACATCACTCTTCAGCTAATAGACGGGGAGTTGTCTTTACTGTGGACAGCGGATTCATTTCCCA
GAGCCACGAGGGGAGATGCGGAGATGTCGCGCGGCCGCGGAAAGCAGTGTTCGGGTGGCCAGTATGTGAGTAGCTAT
TTGCATGCCTAATTCGAAAGCTCAGGCTTCGATCTCCGCTTCCTTTTTGTGCTCTCTTGGCCGTTGTGATTGCTA
TTTTCGGAAGTCCGTTGGTTAGGTTTGAATTTACCGCAAATGCCAGAAAATGTTCTATATTGACTTGGATCACA
CAATGGCAATCAGCTTCACAAGAGATGCTAATATTGCTCTGAGCCCAACAACCTGGTTGTTAAAATATGAAGGCGCTG
TCTATCATGTTCTCAAATTCCTTTACGAGCCACATAGTACTCCCTATAACTAGACTCATATCCCAAAATCCACTCGC
CAATAGAACCCATGATGTTCAAGGAAGCTCGACTTGCAACTTGGCTGAGCCAACGCGTCGGTAATCTCAAACCCAAA
GGAGTATTGGCATGCTTCAAGAACACCATCAACTGGAAGATGCTCGGGTCTCGCCAGCTCTCTTGCAGTCGTCCAA
GTACCCGAAGAAATTACGAAAGAACCTTTCTTCGCCTTCAAAATCTTCAGGCGCTAGGTTTACATCGATAACGAGCG
GATCAGTGCTCGATGCGTTCTGAAGTGTGTGAAACTCCATCTTTGGTATGATTGCCGTTCTGGGGGCGGCGGGATCT
GCGGCCGATATCGTCTTCCAGGGGGCATGTGTGGTATTTTTGTAGAGGTGGCACTCCCCGGAGACAATTTTGAATG
CTCCGACTGGTAGAGATGGAAGTGAATGGGGGATTCACAATTGACGGCTGAGGGCATCGTAAGGTGGATGCGAGT
TGCGCAGAAAGTATTCCGAGCCTTTGCGGAACTCCAGGCATGACTTCCCATTCTCGTAAAAGATGGGATTGTGCGCA
GCTCTGTTTGTAGTCTAGGTGGCGAGGATGATCTGAGAAAACCTGAACATAATGATGGTGGATCCTTTGGATTGGAGTAG
AATCAGTGACGGGGTCAAGGGTTGCCCCGAGAATGGAAGACTTGTATCTTAACATGAAGTAGGCATATTATTTGG
TACGCAAATCGATGATTGATACGGACTCGGGGGCCGAGATACGCGGATACCTCAGGCTCACGGCCCCTCGGATTCTG
GAAACCGAGTTTCCGCCCCGCTTTGGAATGCAAGCATGCCGGCATCTTGTCTTGTTCAGCCAAAGTTGCCTCAAG
CCATTTTCAATGGACCTTTATGTCTGATTTGAATGAGAATTGACACAATTTTCTTTGAATTGTATTCAAAGGAGGAG
ACTATAAACCATGATGTCAAATCGGGAGGATCTGGTTGGCTCATCTGTTGCTCTTGTGGTGTATGATGAGCGGATGC
AGTCGAGCATCAATTCCTTATCACAGCGGGAAAGGTAGAGTTCAATGTTGGCATTAGACATATGATTTTAGCACCAGT
GACCCTCATTCTGGACAAATTC AACGGCGCCAAAATGATGATAGTGATCTGAAATGTCACGCACACTGATGATTTGA
TCATTATCACCTTATCCCTGTTGTGTTGTCAAAACACGCTCTAGATCAGGCGAGATAAGTGTTCAGCTTTAAGCGTGT
TTGCCAGGATCATGTACTAGCTTTGATCAAGCTAACGCACGCCTGGAATGCGGGGTAACAGGGGCAAAGATCGCTG
TTCTTATCTCTAGGTGAGGTGATGAAAGCGAAAAGGCCTACTCACAAACCGACTTGTTCGCCCCGGCCGAGTCTTCAT
GGAATCTCATTCAATTTCTTCAAGTCACGTCGTTCAATTTTGTCAAAGCACGACCGTAGTATCTGGGATTGTTATTT
CAGTTTATTGACCAGAACCCTTCTTCTTGTCCACTAGTGGAGTATGACGCACTCTCAGTCATCCCGGTCTCTCCCA
GCGGTCCGTCCCCTCAATGGCTCACTTGGCGTCTGTCAATGAACTTTGCTGACGCCCGTCACAGTGCAGCCCTTG
CCACGAACGAAAAGTCAGATGTGACCGACAGGATCCATGCTCAAATTCGTTGATGGCAAGGCAAACCTGCACACGAC
TTCGCCCCGGCAATATGCCAAAGGCAAACCGCTGATAGCATCGAGGCTGTCTGCAGCGCATGGGAAAGCTGGAA
GAGATGCTTGGCAGGCAGCTTGTAGCAGCTCCACCTCCCGAGCCAGCACAGACAGCAACTGCGGCCACGATGGAGAC
ATCATCACTAGATACGGAGCCATCTGCAGGTCGACGGCCACGGCGTCGACGTGCAACATCCATCTCCGTTGCACCCG
AAGACGATCTTGCGCCAGCCTCACCTTCAATGATGGACGGGAAGATGCAGGTGCTGCGTTGTGCGCACAGGCTCGC
AGCGTTGAGGACCGGGAGAGTTCTCAACCTAGGAAAACGATCTCGAACCTTTGGTCCGCCTGACTCCGAGCATCGCGA
GGAAAGTGGTGCAGCCGCGGAAGAGACCCAGACGCCGGAAGATCGTATGCTTGCCTCAATTGATCTGGATCGTTATC
TCCAGCCACCCAAAAGACGGGCGGGCCCAATCTGAGTAGTAAAAGACAAGAGGTGCTCGAGTCAGCAATTTCTGTTG
GCAAGAAAGGCTATGCGTGAGCCAGGACTTCACACAAGTTTGGACCAGCGAGTCAACAACCTACGATCCCAGCATGTA

TCCAAGTGC GAATTCTTACACATGCTGCTGAAAGGTAAGATCATCTGCATCTACTGTCTTGATTTAACTTAACGCC
CTCGATAGAGTGGAGCCATAACGATTCAAGTATTTTCATGGAGACATTTGGCTGTCTTCGCCAGCTACCGTGG
AGACATACGCTCTCGACCTCATAGACTGCATCGTACAGACCAGCGTCGAGCGCAGTTCATCATTGTGTCAACTAC
GCGGCCTATGCTTTCATCAGTTGCTTGGAGTCTCCAACAACCGTGCGGATGCAGAAACAGCTCGCGCGCTCAAAGCA
GAGATTTTCGCGACAATGTTGTGGCTGCGCTTCAGTATCTTGACACCACTCCCAGACCGGATATACCGTTGCTTAACG
CCTTGCTATCCGCTGTACGAATCAATCTCCGCACAACATACGATGACGTCGTCACTAACGCAGAATAGGCAATGCTC
ATGCAAGACACGGCAACATGCGACACTGCTGGAAATTGAACACTTTAGCGTGCAAAGTCGCTGTGTTACTGAAAGA
CTGCGCAGTCATTGATTTAGACATCGACGATGATGACTCCTTGTCGAGCTGCAAATTTCTATATCAAATGTTTTA
TCTTCGACACCTCACTTTCTGCGAACATGTATCAGCCTGCGTGTCTGGCCAGTCTAGATATCAACGAAGGTCTTCTG
ACGAAAAGAAATGCGGGACATGCCATGCTCAAGACTCTCCTGTCCATTTTCATTTCGTCGAGAAGTATCATACTCGA
GACGAGGAAATGCGCAGGGCCCAATCGAGCCGCTGGTAGGATAGACACATCTTGCCTGGTAGGCTCAGGGACAAGA
TGAGACTGATACGGGATCAGATCAAGTTTGTAAAGTCACATACCATTCAAATGTTTTATCAGCTTTACGCCTTTATA
ACCCGCGAAGCTAAACAAAACCTTATCAAATTCAGCAATTGCAGTCTTCTCGACCCGATGAATTTCTGATATTTCGAG
TGGCAGACAATGGAGTGTATCTATTACTCGTTGATGACTACTATCAACCGGCTCAGCTCCACAGCTAACGATGATGC
GTCAAACAAAGAGTGCTTAGAAGTATCTCGCAGATGTCTTCTTACATTGAAAGGTCTTCTGGACACAATATCACGTG
TGAAGCAACCGGATAGGTTTCTCAGTTCTTTGGCATGGTAAGTTGCTCGAGCCAAGTCCTTTTCATGCTATGAACTA
AGTCATGGAATGTAGGGTAGCGCCATTGTTCCCTCTCCGACCTATCTACTTCGTGTTCCGCAACGTCATCGAATCTT
TGGATGCACTAGATCTCAAATTTCTCCAGGATCTTGCAGGGTCTCGACGGCCCTGCAAAGTCTCACCCTCAATC
TTAGAAGTTCAGCGCTTGTGCACCTCGTTGGTCAATCTTTACACCGAGTCTCTGAAAAGGCTGTCTATGCCTCCGA
CTATCACAGAAGCAGGCAAAACTCTGTCGATAATACTATGCTAGCCACGGGTGGAGATGAGTCAAGGTTTAGCGCTA
GGCATGGTCTTGAATAAATACTACCAACATTGTACGGGGCATTCCAATAGGGTTGAACCGCCAAGAGATGGGGTTGAC
CAGTACGGTGGCAAGGTGTCTTCGCTACACCTGAATTTTTGATGTCTCATTCTGCAACAGAGCGACTGGGAGCT
GTTTTATGCGCAGCCAGAGGTCAGTTTCGCCAAGGATCTTTTCGATCACGAGGCGGCAGGCATGCGAACTGGTGGAA
GCTAGGGAATTCCTCGTATCTCAACCTTTCTCAACGTAGATAGCTGTCTTCTGTCTTTAAAGCTCCAGATTGGCTTT
GCCGACATTTTTCTTCAAAAAGGTTAATGAGACCTTCGCTGCATTCTCGATTCCCTTCGTGCGAGTTTCAATGG
CCTTCAATGTGCCGTCGGCAATCCATTTCCCAACCTTGACTTGATGCTCTGCCTGTACTTCCCACCCATGCTCTCA
TCAAAAACGCTGAGTCTTTCCATGTGATCCTCTTCCCAATGATCTGAGATGTTGTTCCGATGCCGTATTGTCTATC
GACGGGAATGTTGTAAGTACTGCGATGCGTAACCGCATGCAACTGTTATGAGGAAAGCGTCAGTTTGGTAACATAGACTGG
CTCTAACTAGAGTGTACTAGGTATTCGTAGAATCCACTCACTAATCCTGCCGAAAGCCTTCATATTACCAATCGCAA
CCTCAAGCTGCTCCCGCAACATTGTCATAGTAACTGTAATGGGTTGGATTAGAGCCCGGAGCAAATATGCATG
CCTATGTCTTTTCATGATGCAAACTCACTGTCGATTCCATGTGGTGCCACTTCAGGCAGAATGTCAGCTATGGCAGCA
TTGTTGTAGTTGAAACCGCCATCAAATCCAAAGACATTGGTTAAACAATCGAAGCTTTTCATCGCTTCCGACGCTACC
AATCACCGTCAGCCCCTCGCGCTTGCAAGCTGGGCTACGATTTGTCCACCGCGCCTGAAGCTGCGGAGATAAAAA
TGACTTCTCCCGTTTTAGGCTGCCCGATTGAGTAGAGGGCTGAAAAGGCCGTCAAGCCAGGCATGCCGAGTGCTCCT
AGATACAGGCTGGGGCTAAGATCGTGTAAATTTGGCAGCCGGGTGAAATGGGTAGCTTCAGAACCCGAGACAGTGAC
ATACTCCTGAATCGGGCCATTCCAAGAACGTTGTCGCCGATCGAGAACTCTTGAGTATCTGTTCTGATTACTTCTG
CGATGATGCTGTTGGGTACGACTGTACCGACGGCGAGAGGCTCGAATCCATCCCTGGCATTCTCTTTGAAAACGAGG
CGGTGTGCAAGATAAGGATCAAAGAGGCGAATAGCACTTTGGAAGTGAAGCCGCTGTGGGAGGGTCCGAGGTAAG
ATCAAATGATTCTGCTGAACAACCTTCAGGTGTTTTCCGGCCACAGGCAAGGAATCAGGAATCTGAAAAGACTA

AACCAAGATTTTCGAGACCTGTTACAATGATCATTAAAGCTTCCCGAGGTATACTGGAGCAGGAAAATTTGCATGAGAT
CCCATGCCTTTTCATGATGAAAACCATCTTCACATATATCTTAGCCATGCAAATAAAAGTATTTAGATGCGCTCGACT
ATCCAATCGGGCAGGCAGCTCAATATCCTTGCTCCCATCGGATCCTCTCCGGGCTCCGCCAGTGTACATGCAAGGG
TGATCCGGACTTTGGAACGGGCATCCGAGTCCACGCAAACCTTTCAACAAGGCCTTCTTGTACCACGCCCCGCTTCAG
GGTTACTAAAAAGTAAAGAAAACCTGCAGGAATCTCTATGGACAGGGACGACAGAGAGTTCAAAAGCTGGAATGGCAT
TGAGAATGAGAAAGTACGAAGGAAAAGAGGGCAGCTATGCGAGTAGCACGATCTAGTTGATAGCTTGGATTAAGGCC
TGTGGACGTCGGGCATTCAAAGAATGAGAATTTTTCAAGATCCCCTTTTCAAAGTTTATATGTCTCAGAGCAGACTT
GGTCCTTCGTA CTATTATGGGGTATAATATGGCAATGTCCGCAATTACTTGTGAGACTTTTGGGAAGTAACCACA
AACTCAGATTTGCATCTTGTTTCAAGGCCCAAGTCTTGATCTAATACAGTACATGATATCAATGATAATGAGAAGT
TGAGCATGGGTCAAAACCCGTGCGTGCATAGATCTAGAATCGAATGCTCGGAGAGCGAACACAATCATTGAGTCTTT
CCATACCCCAAGAGCCAGCCAATCCCAAGGTGCTGTCTGTTGCATATTTCTTGCTTGATGGGTGCGTCTGAAAATT
TGATGCAAACATGTGAGGAAGTCCCGGTACACATCGACTCTTGTGGGAATTCATGTTCCGTGCGCAGGATTTCGTT
CGTAGATCAGGGCTTCATCGCGTAGGATATCAAGCCGCATATTTGAAAATATGTCCGAGGCTGCCCTTCATGGCCC
GTTGGCCAGTTAAGCGGACTCCAGATGTGCGATTGTATATCGTCCGGTGCATGCTTCCGTGTACATATCCATGAA
GGCCTTGTTCAAATCGGTGCCAATGCGTTTTGGTCCCTGCTACCATAGTACTTCGGTGCCGAAGTCCACACCCACCTG
CTGGTGCAAGCAGAAGAGGCACGTTTAGCCACAAACCAGACAGCTTGGGTGCGTCCCATGGTCATGCATCGTATGA
GAAATGACTACGGCGATGTTGCCGCTGCTGATGTGCCTCCAAGGACGAACCCAGGCCAAGTCCACACCCACCTG
GGCGGAATTCTCCAGGACCTGAGCGGGAGTTAGTTCTTGCTCCAAAAGCCGAAGGGAAAATACCATTTTACCG
CATCCCAACAATCGTTTTGATGCGGTTGAAAACCTGTGTTCCGGAGCCAACCGATAGCTGAGGCTTAGGGCAACGCAT
CCATACGCCGCAACCGCCCGAACGCAGTTAGGTCCCTCCATCTCCGGGACCCATAGCAGAAACCACCTCCGTGAAT
CAAAATCAGCAGAGGCTTCGAGGATGTGGCATGCGAAGTTTATAAAGCAGTGTTCGCGAAGTTCCTCCATCCCTCC
GAGGCAGCTGAAGCTCTTCGCAAGTGACCATATCCATATGTTCTTTCAGAGAGCCATCGGCCACCTTCTTGTAGAGA
GGTGCCCATACGTCTCGAGTAGCAACTATGCGATCAATTCGAGTCTCTTTTTGAAGGCCGCGAGCGAGTCGTCCAT
GATCTTGAGACTCCGATTAGTCAAGGGCAGTGCAGTACGGCACGGGTCTCGACTTACGTCTTTCAGAATTGGGTCC
ATTATGCCCAGACGGAGCCACGAACTAGGCTCGTCAATGTTACGGACATTTTGGGCTGTAGGAATTTGGCGCGATA
GTTCTGATTTCTGTTCTGAGAGAATAATGAGGGGTGGTAATGCGGAAACAATTAGGAACAAGACTTTCCTCATAGAC
CCCTCAACAAGCTCACAATGGCGACCCAAGTAGTATTTACTAACATAGAAAAGTGCTTGAATAGACGTGAAGTTCC
GATCCTTTGCTCAATGCCGTGCATCGGAATGTCCGATGCCGAGCTGTCAAGCTCGGAATGAGCCGAAAATGGCAAA
CTTGACAGGCAAGTGGTTTGATTGTATTCAATTTGACGCCTCGGCCGTGTCAGACGTCTGACTTCTATAACGCATT
TCATCCGTGATTTATTGCGACAGCCCGTCTTCCAATTACCTCGAGGAAAAGATCACCAGGTGGCACGCTACAAT
GAGTGACAGGAGCTGGACACATCAGGCAAAGCCAAACCCACTTCTGCACCCAAAGCTTGGTCAAATCCAAGGAAGGC
TCAATAAGGGAGTAGTACAATACCTGGCTTAAGGTATGCAACTCTGAGCATCGCCTCGCGGAACCAACATTGGCG
ATATCTCTCGACAAGCTCGATGCTACTCGACATGGCCCGCTGTTCTCACTCCTCCCGATCAGAACAATTAGAGAA
ACATTTCAATCAAATGGAATAACCTGGCTTTGAAAAGCCGCCATGTCAGATTTGCATGGACTCAACTGAAATGTCA
CAGTACCACTGGAAGGAGGCCACAGATTGCCCGTTGTCGTGTATGTTACGGTGGCGGGTTCGTTTTCGGCTCTGGA
AGCTATTCACACTACGACCAAAGTAAGGTCGTTGAGCTTCTTCGATCATGAACCAACCGATTATCGCAGTCAACAT
CAAGTACGTCAGCGAAAGATTCTCGATGAAGATCATTGCTGAGACTCAAACACCAGCTATCGTCTGGGTATAGCCGG
GTTCTATCTTCCGAGGAGCTTACAGCGGCAGGGATTCTTCTAACCGGGGTTGCTGGATATGATTGTTGCGTTAG
GATGGTTGAAGACATTCATCTCGGGATTCCGAGGAGATCCCGACAATATTACGGCAGTGGGCCAGAGTGTGGTGTCT

GGTAAGCATTCCGAAGAATGGCTGGGTATGAGTTTTCTCTAAACATTAATTTAGCTTCGCTTTGTTACCTACTTGG
TCACGAAGAGCCTTTATTTCAGACAAGCTGTGCTTCTGGGCGGCACATTTCTCATGATGAGACCGGATCGACGAGGC
AGGCAGAGGTGCTGTATGGTGAGATTATTGACACTCTTGGATTGACTAGTATGTCACCGAATGAGAGATTGAAAGCG
CTGCTTTCAATGCCTAGCGACAAGCTGGTACCAATGACTCCCGATGTTGTTTCGCTTGGGGCCCGTCATCGATAATAG
CGTCATTCTCCAGAAGCCAACCTTCTCGAACCTGGGCAACAATGAGTTGATCCTTCCTGGAAAGACTTGGTGTGAGA
AAATATACTTAGTGCAGAGTGAATTTGATGTAAGTATTAGTCGAAAGATACGTTGCTCTCACTGACCACATTTAAGG
GATCAATTTTTGATCAGGTAAACCTTGGTTTTGCGGCCCGGGGCGTCGGAGATGCATTTTCGTCAACACCTTGAGGAC
TCTTTTGGCGTAAAACGTGCTGCTATCGTCATAGAGACCTACAAGCTCATGGGAAACATTCCAGACTCTTTGGCTGT
TGAGAACATAACAAATCTGATTACAGATATCATGTTTCTCGCACCAGCAATAGCGCTCAGCGAAGCTTGGGTTGGAC
GAGCAGTCTTAGGACTGTTCAATGAGCACAATCCATGGAACGGGCCCTTACAAAGGCAAAGCAAATCATCTTCTGGAC
GTCGCTCTTCTTTGGGGAAACTTTAACGGGGTTTATGAACAAAAACCCTGGACTGTTGCCCGAGCCTTGGCAGAAAG
CTTTGTGTCATTTCGTCAACAACAAGGTTGACCTTCCGCTTTTCGATCAGCAGGAAAGAGTAACTGTCTTCGGGCCAA
GTGATGAAGATGTGTCAAGCACTATAGTAGGCTTGAAGGACGAAAAGGCGAAGAGAAGCCGAGACATCTTCAAACCTG
GCGGCAAACGTTGGCGGCCTAGACGCACTTCTAGATTCAGTCCAGAGCTTCTTATCCAGCTAGAAAATGATGCAACC
ATACCAATATTGAAATTGCAAGAGATGAAGATCAGATGTCATGTGTTTCATTAGAATCTAGGAACGGGGAGTCAAGA
AAGTGAACCTCAAGCAAGGTAGAAGAATAGTGACGATGATACAGGTGACGGAAGCTTCTGCGGAAGAGCCAAAGGAG
ACATAGTCGCCATATAGAACTTGTACAGGCGTTTGAAGCGTACATATGAAACTCTCTGGTCAATATAGAGCTTCCG
ATGTGTCTGTAATTCATACCCTTTAGATAATTATTGATATCGACGAATGTATCTCATAACATCGTCTATTGAATTT
CTAAGGCCATCCTCGCGACAGGTTATCAGCAAGCAGCTTCCAAGAAGCTGATCGAGCGTTTTGAACGTCAAAGTCTT
CATAAAGGTGGGAAGATTAGTTCCCGGGATGTCAAACACACCCGATGCCATACCTATCATTTCGCTGCAGATGACCG
AATTGAGATCTTCCCTGCTGAGGGGAACAATTGATAGCAAGCTTTGTTTGATGGCAATTCGGTCGTACATTTTGT
CGGAGAGTCTCGAGGCTGGTAGGGCATGTTCTAGAGGACAATTAATATCAACGAAAGAGCAGGAGTGAAAATAG
TTTAGGACATACTCAGTTGGCGAACGGTAGTTGATAACTATTGAACTCGCTTGAACAAATCGTTTGACAGTCCCTG
ACATTGCGGAACCGCAATGAGATTGATCTGTGCGTCGGCAGCTCCAATCCAATGGAGGTTCAATACGGAGACGACG
GTGTCTACTCCAAGCCTTTGAAGAGCGTCGCTGATCTCTGAAGCAGACTCATAGCTGATCTTGACGACGGGGCGAT
GTGATGGTCTCTGGCCTAAGACGGGCGGGTAAGTCGATATGAACCGTCAATGCAATATGATCGCACAAAACATCCTT
GATCTGAAACCACTGATATATTGGGCACTTACGCTGCGTGAAAGTATATGAACTTGATGTTTTCTCGACTCACAAT
TGACTGGACAATGGTTTCGGCCGAGATCGCCAAGGCCACCAGCTACTGTAACAATGCCATGATGATGAGCTGAGGAG
AGTTCTGTTTCATCGACAGCAAAAATATAATTACTTGGTGATTTACATAGAAAATTGGACTACGGATACATGGTTTGG
AGACAGTTGAGAGCGTCCGTGTCGATTATCCGAATCCCCGAGTCTCCGACAACCTCATGAGGCTGCTCTATCATAACGA
ATTTGATGATATGGTTCAAAGCATGGAGAGTCTCCATTCCTGCAATACATTGGCCGTTTATCCATTTTGAATTTCT
CCTCTGCCAGCCAAGCCACAGTCCAAGCGATGTCTCCCGGGTCCGCCACCGCCCCTTACAGGGAGTTTCCATCGAG
AAGCCAGCCAGTATGGTATCAAGGTGTTCCGCGGCGCCCTTTCGAAAGGTTTCTGTATTTACAGGACCGGGCGCAAC
GCAGTTTACTGTGCATCCGTACTTAGGAGGCAACTCCTTCGCCACACCTTACCATAGAATCCAAAGCGCCTTTTCG
ATGCTGAATACGCAAGAAGTTCCGGTTGGGGCAATCGACTTGATCCAGAGCCAATACAAATGATTTCGGGCCCTTTT
TTGTTCCCCGAGAGCCGTGACTTTGTTGTGCGGATCGTATGGTGTCAAATGTGGCAGGGCAGCCTTGGTAAGGAGAAA
TGTGCCACGAGCGTTGAGGCGGAAGGTCTCATCCAGGTCTCGACAGCTAAGTCCCAGGTTGGGAAATGAGGTACGA
TGGCGGCGTTATTGACCAGTATGTCAATGACACCGAACCAGGTTACGGCTGCTCGGATCAAACCTTCCGGCCCTTCC
TTTGTGATAAGTCGGCGCACACAGCGATCCAAGGCGATTTACATCGCTGTCCACTTCGACACACGCAGCGTCTTC

CCCTGCATGTGGGTAGTTCAAACTATGGACGCTCCCCTTGCAGAAAGTTCGATTGCAATTGATGCGCCGATACCAG
CCGAAGAGCCGAGATCACAGCCGTCTTGCCAGCGAGACTTCCCGGAGTCGTCAGCATATTTGCGGGTTTAGATAGG
GGTAAATCGTCCTGGTCGTTTGTATGACCAAAATATTGACCCCTTTTCTTATGTCGAGTGTGGGATCCTTTTGACCACC
CGACACAAGCTCCAAAGTTCGGCATCAAGTCTCCGACTTCGTTAGCTTCGGAGGACGTCCCGCGTGGTAAAGGTCCC
TTGCATCGGATCTTTGCATCCACACCCCGCCGTCAATCACGGGTCTCCCGAATTTTAGGCCGAATGTGGAGGATCG
GCAGTACGTATGTACCTTCGCTCAACACCAATGCGGCCAGAGTAACTCAAGGAAGGGTGTGGTAAATGCCATTCAA
TCAGAAACCACACAAATACGGCGACAAGCTGATATTCCTTCGATCGAAAGGCAACATATCCCCAAGAGACAGATTTG
CCAACATCCGTTTCTCTGTCTGAATCAATCTTCTGCGTCTTTCTGACACACGATCATGATTATCTGCGATATATTA
TCTGTACGCCACGTGCTGGGTTAGCGGCAATTGTTGTAGCAATCTACGTCGCAGTCTCATTGCTCCGATGGGCCTG
TTCGCCAAAGCCAAAGGTGCGAATCCTCATGGCCGATACTATAAAAAGTTCGCGATCACGAGCCTTGGAGTACTGCT
ATCACCCCGAGAAGTGGCTTGAAGGGATATGAGCAGGTAAGATACTACAGCTTGAGCATCATAGCCATTCAAAC
TGAAAGTCGTAGTTTCGAGATAACAACATACGGCATGGATACTAGAGACGGTTAGTTCATGAAAATCGTCAAGAGCC
TAGCTAATTTTGTTCAGGAATCAAGGTGGTTATTCACCCGAGTTTCTCGATGGCCTCAAAGTCATCCTCATCTTA
GCTTCAAAGCCTCAATAGATAACGTGAGTAGAGGTTGGCCTGTAGGCTCACAATGAGACCTCACGCTTGAACAGG
ACATGCAAAAAGAGTACACAACTTCGGAGGACCTCCCGAATTCCTGATTCATGCCATCAAAGCGGCATCACGGCT
TCCTTGCGTGAGTAAAAGCTGCAGCATATTTGGTAAACATGAATTACTAAAGATAGAAAGCTCATTGACACCTCT
GCTGCACAGAATGGTAAAAGAAAATATGGGACGAATCTTTGGCTACCACACTGGTGTGTACGACGTTTCCGGTGACC
TAGCATCTGAATCGTGCGGCCAGGCTGAGTTTGAAAACACTGACGGATCAATCTTAGAATGGAAACGAACAACAGTTC
ACGATCAGATGTTGCAAATCGTAGGTTGTAACAATGCCCGTGTCTTCTCAGCACTGAAGCCAGTCAAACGATGAC
TGGATCCGCTATTCTACGGGTTACGTAATCCACCTTCGACTGCATCCGTAAGATCAAGCAATGGCACCCCATGCT
GCGGCCAATGGTTTACTGGTTCTGCCCCGAAAGAAAAGAGATCAAATGCAATGGGCCTGCGCCAAGAAACATGTCA
AGAAGGCCATGGAAGCCCGCCAGCACAAAGGGCGACAGCCTCGAGAATCCACCTTCCATGCTGGACCTTCTTAGCTCT
GGCAAAAACAGCCATCTTGCCACGAGAATGGATGACCAAGTCTCTACCAAATGACACTGATAGCAGTTGGGACGGT
CACAACTCATGCATCCATTGTCCAGGCCGTCTATGACCTGGCCACCTATCCCGAATACATTCCGATTCTGAGAGAAG
AGATTCAGTCGGTATCTCGAGATCATGATGGTCTCTTCACGAAAGATGCTGTTATGGCGTTGAAGAAGTTGGACAGT
TTCATGAAAGAAAGTCAAAGACTATCTGCAGGTGATCTGAGTAATGACTTCCTGTGGCATCATGTGATGAACGTAGT
AGCTGATCCGCTGTTCTAGGCACATTTACAGCGAGCAGCTACGGCACATCTTACACTTCCAGACGGAACCTTTATAC
CTAAGGGCACGAAAATCGAAGTAAACACAGCATCCATACATGTTGACGAGGCCTACTACCCCGACCCTCAGAGGTTT
GATGGACTGCGATACTATAGGCTACGTCAGAGACCGGGCGACGAGAACAAGCACATGTATTACAGTGTGGAAAGAA
CGACCTATCGTTCCGGCTTTGGAAGGCATGCTTGCCCGGTAGGTATCTGGGACACCTCAACATCAAGCTAGTGATGG
CAGAACTGTTGATGGAGTACGATGTTCCAGACTACTTTGAAAAGTGGCCGGCCGAAGAACATCGAGTTTGAGGCACTT
GTGGCCCCTGATCCGGACTTTGAAATCTTCTCAAAGTTCGACGTCATAGCTAGGGTAGACAAACAGCTACTCCGTA
TCGAAATCAGTACTTTGTCTGAGTTTTCAGTAAACATACTGCTGATTGTGGCCAAACTAAAGAAAGCGGCTCGGGAT
TGAAAAGGGTATATGAAATTGACGCTTTTGAATCTGCCGTTGCTGGGCTCCAAAAGACCACTACTTTTCTCTTC
CATTTAACATGATATTCCTTACGACTACACAGAATGTTTCGTAAACAAGTCCCTCTTGACATCTTACATTCTTCTTC
GTTGCGAGGGGTGCTTTACCACAGCATGCATTGGGAAACGTCTATCCGCCATCACCGAAGACCTAACTCTTGATTTT
TCTGAGTGTGTGATCTACGCCGAGGTTGATTCATCGTTTCGTGTTCTCACCTATCTAGGATCTTTTCAAACCTAGA
AACCATAGAGGGGCACGGCGAGGTAAGTGCAGGAGGCGTGGGTGGGGCTTGATCCTTCGGATTCCGATTTTCC
ATGCGACCTTTTCGATAAGCCCGCTTACCCTCGGGAACCTGGAACCCGGCCGAATCCGACCACGCGAAATTTCC

AATTGGTTGTAATGCCGTCTGTGATTTCTCTGAAGTCACCGCTTGCAAAATTGCCTGATCCATACTGAGGCTCTCA
TGACTTATCAAATCAGATTTTCGAGTGAGTGTGGTGGAGCACTTAGACTGGATGCTGAGTGCTATCTAGCCAAAGAT
CATAACACATGCGCAGACAAGTTTGTATTTCATATGACTTGATCTTTTTCGTTTATTCCTTCCAGTTGATGGCGCTCA
TATTCAAGATCATTCCCTATTACCCAGCACTTAGATCACATTTTTGTATCGCATCCCACAACCTCATGATGACTACGG
TAACTGATAAACGCATTTTTTTCGTTGATCGTGGGTGCCGGCATGTGTGGAGTCGCGCTAGGAGATCGTCTAATTCAG
ACTGGCACTTTGAGGCACAACGAATTCATCATCATTGACAAGAACTCCGACTTTGGAGGAGTGTGGAAGATGAACAA
GTATCCGGGCGCTGCTTGTGACATTCCAGCCATGCTTACGTGATGAGATGCTTTCTCAACCCAGGTAGGTTCTTTG
GCGTCCCAAACCTATCCAATCATTCCATCATGCTAATAATGCTTGAAAAAAGGTTGGACGAAGAAGTTTTCGGGAGG
GGAGGGAGATCCAACAGTACTACGTTGATTTTCGCCCGCAGAAACCATCTCGAACGGAGCACTGTTTTCAACACTGTT
GTGCACGAGGCAAGATGGAACACATCAGATCGACTATGGGAAGTTCTCGTCGAGGACGTGTTAACAGGTAACAAAAC
ACGCTGGATTGCGAACGTTATTTACGATAACGGTGGGGGCTTTCATCACCCAAAGTACGCCAACATTCCGGGTATCG
ACAATTTCCAAGGCGAGCAGTGGCACACCGCTGAGTGGCCCAAGGACAAAAGCCTCACAGGAAAGCGGGTAGGTCTG
ATAGGTACGGGCCCCAGCGCGGCCCAAGTCGCACCCAAAGATACAGCCCGATGTCGAGAACTGTACGTTTTTCAAAG
GAGCTGTGGTCATGTTCTTCCCCGCAACAACCATGCGATTCCGCCGTGGAAGAAGCTCTTGTTCAGATCTGCTATC
CTTTGCTGTGGCTATATCACGTTAGCTGGTTCATTTTCGTGAGTCTAAAATGATATGACAGTATGCTCAATCTTCA
TGCTGAATCTTCATGCTGACTTTGTCAACAGTTCGACCAAACCAAGGGCATGTGGATGAACGGGACCAAGAAAAATC
GTTCCATGCACGACGCTTGTCTCTCATTTTTTGGAGAGGGAAGTTGAAGACCCGAAAACACGAGAAAAGCTTCGACCC
AAGAATGACTTTGGGTGCAAGAGGGTTTTATTTCTGGACGACTGGTATTCTCTATTCAACAAAATAACGTGGAATT
GGTCACCGAGAAGCCCATCAGGATCACTGCAACCTCCATAGTATCGAAGACTCCGCAGTCACTGTCAGACGAAGAAC
GAGCTGCTGGACCTACCGATCATACTTGAGACACAGGAAGAGGATCGGACTGGAGAAGCTACTCGCGAGATCGAC
GTACTCATCTGGGGGACTGGATTCGACATGAATGATTCCGGTGGCCACTTTCAGATCTATGGAGAAGACGGAAAATC
TCTGTCTCAAAAATGGAGAGACTATCCCGAAACATATTGGAGTCAGTGTCAAGACGCCTTTGAGATCTGTTCTGGTC
GCTGATGATTTTCATCTCAGGTGTTGGTGTATCAGGATTTCCAAACCTGTTCCCTCACTTTGGGACCCAATTCTACTAA
CTACTGGTCAAACATCACCACAGTGGTTGAAATACAATGCAACGGGCATTGTAAAGTTCTGAGGGAGATTAGGCACC
GATCTCAACACGTGCCATACGCGATCCACCCGAGCCAGGAGTACAGAAGAGATACAATGACTGGCTTCGAGAAAAT
CGTGGCAATCCAACGTTTCTATCGTCCAGCTGTGCAACTTACCACAAGGTTATTGATTCCCTGGTCGCTTTTCAATC
GTGAGCTAACCTTGATTATCTTTCCAGACACCTTCCGGAGCGACACCAATGTACAATCATTATCGGATCTGGGACT
ATTGGTGGAAAATGAGGAATCCAAAGATGGAAGACTTTGTTGTTATCCATGGGAAACAGTAACGTCCTGGAGCTGAA
TAATGCGGAGTCATCTTCGATGAAAATTTTGAAGCCTCTTGTGCGAGAACCTACGGCATTGAGAGAAAATTCGTCGA
GGCATCAGTGCCCAAGTTGTCCGTGGTAAGGCTATAAATGTGGACTTCGATGCCGTGCGGTGGGGCCATAGAGACAT
GGATAACAACCTGCAACCTCTAGGGTGCGGGGAGCGTATATTTTGGGCAACTGGCTTGCCTTAGGTTTGATTAC
CTAGAGGAAGCTAGTTCATATCATTTGATTTTCTGCCTCGAACCTCCTGACTGAGATCCCCCAATGGACCTTCCATA
GACAATCAGAAAACGCTACACATCGAGTCCTCCTAACCATCGTCCAAGCCTGACATTGGCCCCGGGAAAGGAAGGG
AAAAAGCAGTAACCTAGGCGACAAGATAGTTGCGAGTGAACGAAGAATCGACAAAACCAGACAGATACCGAGCACGC
CAATCACCAGCAGCACGAGA

[0011] <210>2

[0012] <211>21

[0013] <212>DNA

[0014] <213>

-
- [0015] <220>引物P1-F
[0016] <400>2
[0017] 5' CTTGATGGGTGCGTCTGGAAA 3'
[0018] <210>3
[0019] <211>21
[0020] <212>DNA
[0021] <213>
[0022] <220>引物P1-R
[0023] <400>3
[0024] 5' GGCAACATCGCCGTAGTCATT 3'

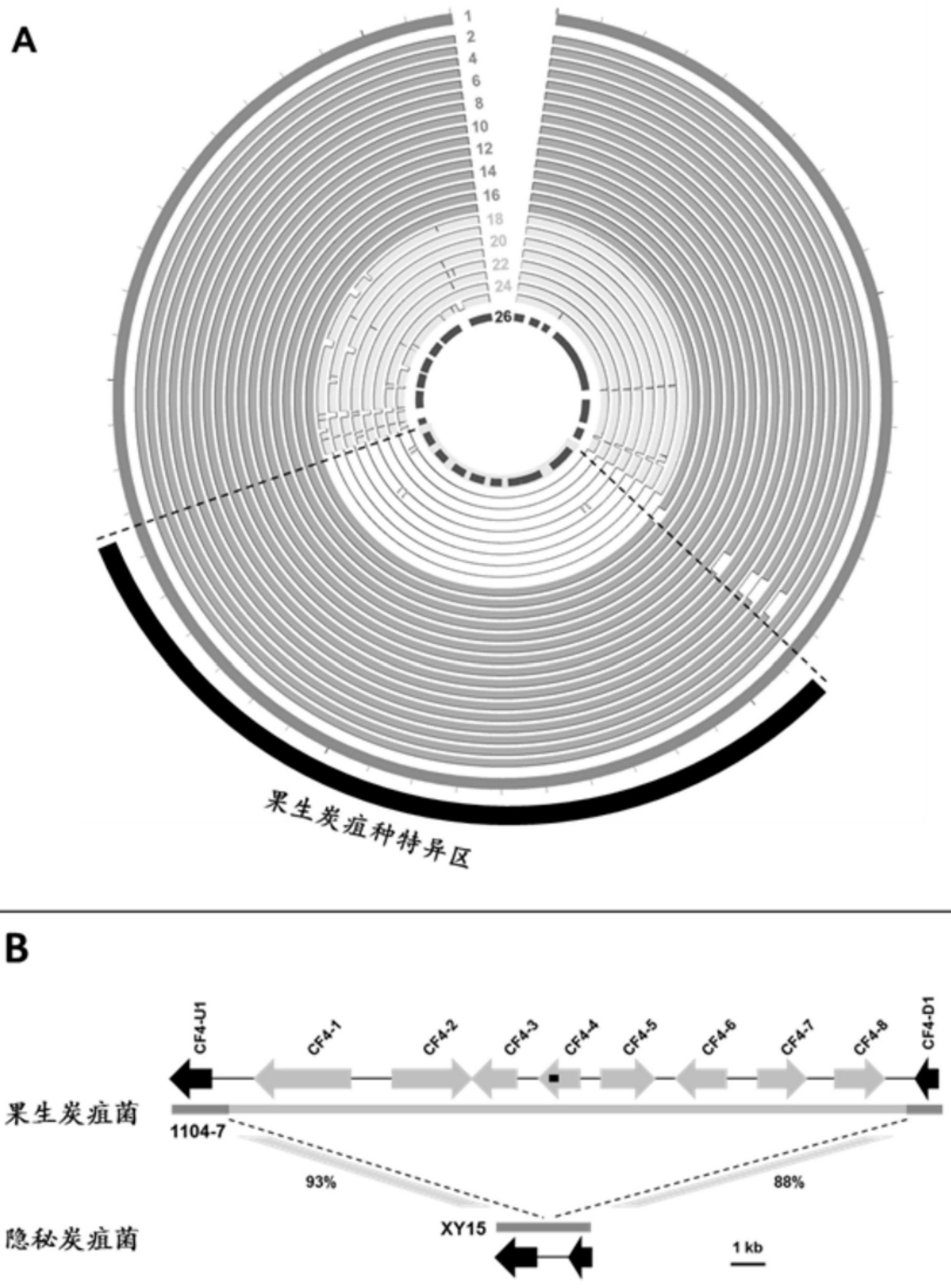


图1

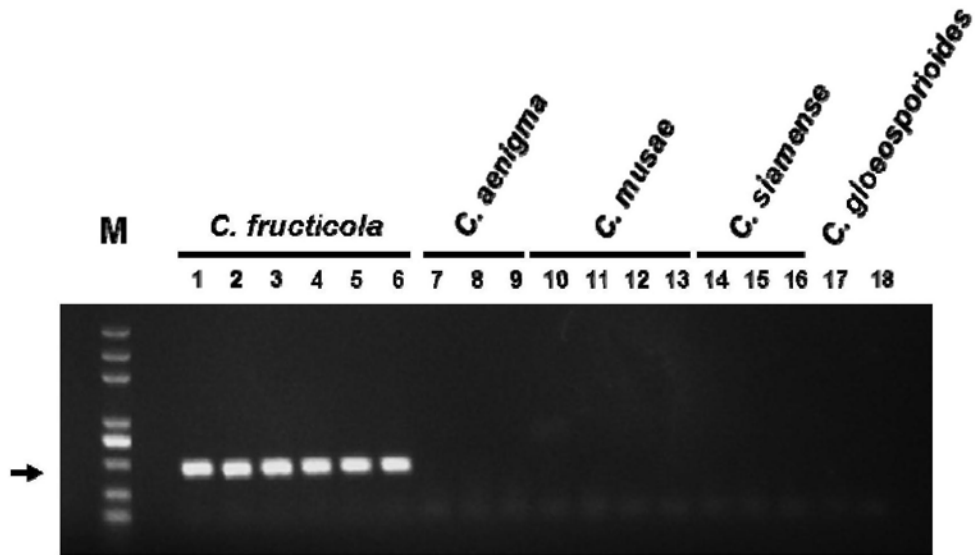


图2

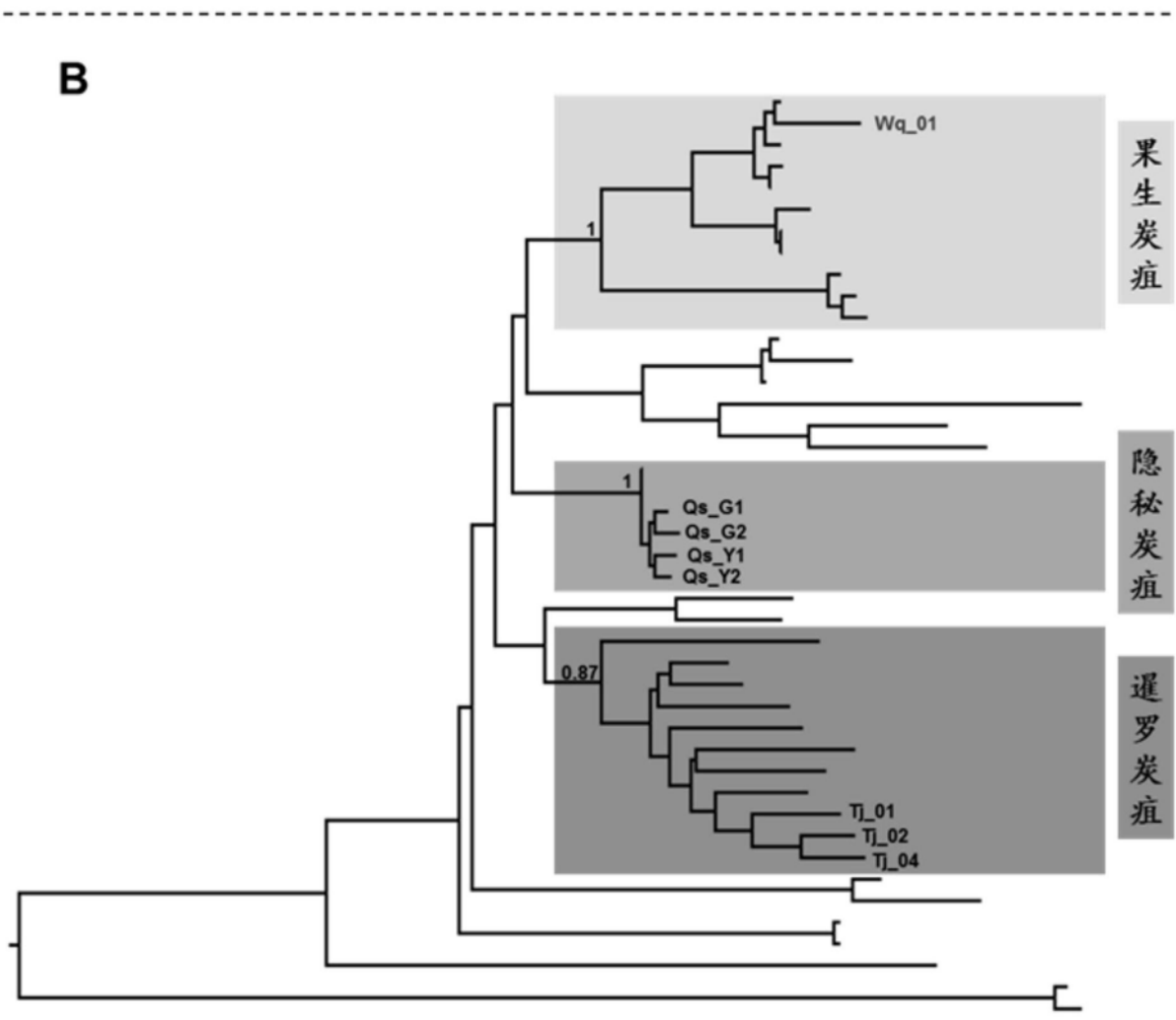
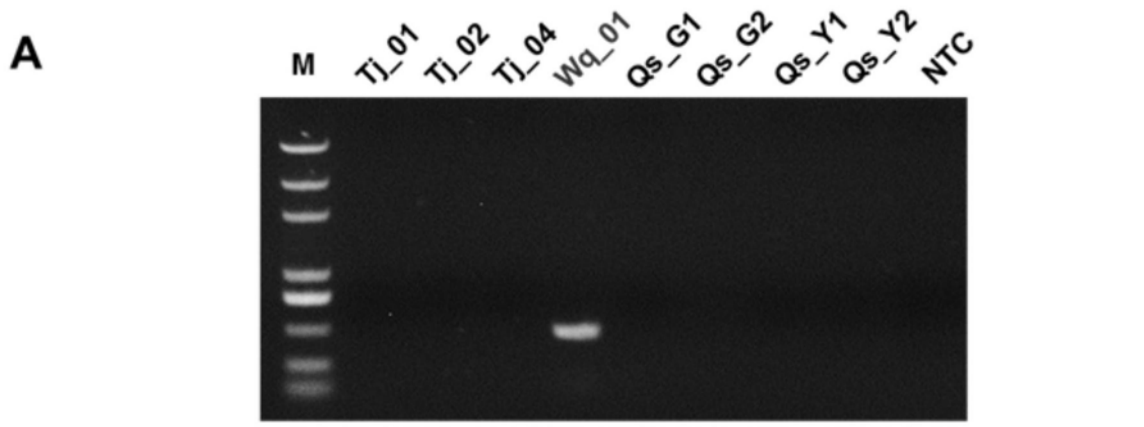


图3