



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109880890 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 201910284640.2

C12Q 1/6888 (2018.01)

(22) 申请日 2019.04.10

审查员 陈依晗

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109880890 A

(43) 申请公布日 2019.06.14

(73) 专利权人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省咸阳市杨凌示范区邠
城路3号

(72) 发明人 潘传英 高佳阳 闫海龙 蓝贤勇

屈雷 张宝 陈宏

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任

公司 61200

代理人 范巍

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6858 (2018.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测
方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法及其应用。以待测山羊全基因组DNA为模板,通过PCR扩增山羊HIAT1基因部分片段,再进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果鉴定山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性位点的基因型。相关分析结果发现,山羊HIAT1基因15-bp插入/缺失多态性的不同基因型与陕北白绒山羊的生长性状存在显著相关关系,可作为提高山羊生长性状的DNA标记。本发明提供的检测山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的方法,可应用于山羊分子标记辅助选择育种中,加快建立优良生长性状的山羊遗传资源群体。

1. 一种山羊*HIAT1*基因插入/缺失多态性的检测方法在陕北白绒山羊分子标记辅助选择体尺性状育种中的应用,其特征在於:

所述体尺性状为陕北白绒山羊胸围、胸宽和胸深;

山羊*HIAT1*基因插入/缺失多态性的检测方法,包括以下步骤:

以待测陕北白绒山羊基因组DNA为模板,利用PCR扩增包含陕北白绒山羊*HIAT1*基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段,对扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定所述插入/缺失多态性位点的基因型;

所述PCR扩增采用的引物对为:

上游引物:5'-AGAGCCTCAGTTTCGCTTATT-3';

下游引物:5'-GAGTTTATGAATCCAGCAGTTGT-3';

根据电泳结果,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型表现为198 bp一条带纹,插入/缺失基因型表现为198 bp 和 183 bp以及异源双链条带共三条带纹,缺失/缺失基因型表现为183 bp一条带纹;

所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型作为提高陕北白绒山羊胸围、胸宽和胸深性状的DNA标记;

所述插入/缺失多态性位点的核苷酸序列为ACTAGTGGACTTCTT。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:所述PCR采用的反应程序为:95 °C预变性5 min;94 °C变性 30 s,68 °C以下退火30 s,72 °C延伸20 s,18个循环;72°C延伸10 min;所述电泳采用质量浓度为3.0% 的琼脂糖凝胶。

一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术与家畜育种领域,涉及山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性(indel)位点的快速、准确分型检测及其在分子标记辅助选择育种中的应用。

背景技术

[0002] 动物育种技术主要包括以表型和表型值为基础的常规育种技术和以DNA多态为基础的分子育种技术。分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)育种技术作为分子育种技术体系的重要组成部分,广泛应用于实际育种工作中。MAS育种技术可以在DNA水平上快速准确地分析个体的遗传组成,通过杂交将目的基因转移到需要改良的亲本中,将目标基因型的鉴定与传统育种相结合,从而实现对基因型的直接选择,提高育种目标的定向性。MAS首先检测候选基因的DNA多态性,然后分析多态位点与遗传性状之间的相关性,最后再根据与遗传性状显著相关的DNA标记进行性状选择。该方法在克服表型鉴定的困难、早期选择、进行无损害的性状评价和选择及提高回交育种效率等方面具有优越性。

[0003] 寻找重要功能基因、筛查重要基因遗传变异位点,并分析变异位点与生长性能的相关性,是标记辅助选择(MAS)技术应用的前提和关键。插入/缺失多态性(insertion/deletion, indel)是一种分子标记,是DNA或蛋白质序列水平上发生频率仅次于残基替换的改变,indel是人类基因组中一种特殊类型的二等位基因遗传标记,表现为基因组中插入或缺失了不同大小的小片段DNA。与SNP相比,indel均是源于单突变事件,其突变频率较低,相对比较稳定,在结构上属于二等位基因多态性,能够通过很小的扩增子(<50bp)进行扩增。

[0004] indel大致分成以下5大类:(1)单碱基对的插入/缺失;(2)单一碱基的插入/缺失;(3)重复单元为2~15个碱基的多碱基对插入/缺失;(4)转座子插入/缺失;(5)任意DNA序列的插入/缺失多态性。随着比较基因组学的深入研究,indel为理论研究和遗传育种应用研究提供了大量的生物信息,其作为新一代的遗传学鉴定标记,兼具SNP的优点。indel多集中在人类和各种农作物(如水稻和玉米等)的基因组研究中,在畜禽上则集中在对鸡生长性状的研究,在反刍动物上研究和应用甚少。由此,对反刍家畜的功能性基因的indel标记研究亟待开拓和深入。

[0005] 随着人们生活水平的提高,社会对山羊产品的需求不断加强,但近年来羊肉、羊奶、羊绒等羊产品严重短缺。在高产、优质和高效的山羊育种目标上,通过对在DNA水平上筛查的与山羊生长发育性状密切相关的DNA标记进行基因多态性的检测,以及基因多态性与体尺性状的关联分析,从而利用MAS加快建立优良体尺性状山羊种群一直是关注热点。

[0006] HIAT1基因(Hippocampus abundant transcript 1),又称MFSD14A基因(Major facilitator superfamily domain containing 14A),位于山羊的3号染色体,拥有一个转录本。目前,关于HIAT1基因的研究还相对较少。有研究指出,HIAT1基因可能编码一个糖转运因子,当在小鼠中敲除该基因后,小鼠会出现精子圆头症以及不育等问题(Doran J et al., 2016)。此外,还有研究表明,HIAT1基因是一种细胞内神经元膜边界蛋白,在高尔基体

和内质网中表达,在小鼠脑中受饥饿和高脂肪饮食的影响程度不同(Lekholm E et al., 2018)。在大型哺乳动物中,有研究表明:HIAT1基因可能是影响水牛乳脂肪和蛋白质比例的候选基因(Liu J J et al., 2018)。有研究对山羊全基因组进行重测序,发现HIAT1基因在肉用山羊中相较绒用与奶用山羊具有显著性差异(Zhang B et al., 2017),但是,目前尚未见到关于HIAT1基因indel位点及其与生长发育性状存在显著相关的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法及其应用,可以快速建立优良生长性状的山羊遗传资源群体。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0009] 一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法,包括以下步骤:

[0010] 以包含HIAT1基因的待测山羊全基因组DNA为模板,利用PCR扩增包含山羊HIAT1基因内含子区插入/缺失多态性位点的片段,对PCR扩增产物进行电泳,根据电泳结果鉴定所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0011] 优选的,所述插入/缺失多态性位点选自山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性位点。

[0012] 优选的,所述PCR采用的引物对(P1)为:

[0013] 上游引物:5'-AGAGCCTCAGTTTCGCTTATT-3'(21nt);

[0014] 下游引物:5'-GAGTTTATGAATCCAGCAGTTGT-3'(23nt)。

[0015] 优选的,所述PCR采用的反应程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,68℃退火30s,72℃延伸20s,往复18个循环,第一次循环后每个循环退火温度降低1℃;然后72℃延伸10min。

[0016] 优选的,所述电泳采用质量浓度为3.0%的琼脂糖凝胶。

[0017] 优选的,根据电泳结果,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型(II)表现为198bp一条带纹,插入/缺失基因型(ID)表现为198bp和183bp以及异源双链条带共三条带纹,缺失/缺失基因型(DD)表现为183bp一条带纹。

[0018] 一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测试剂盒,该试剂盒包括用于PCR扩增上述山羊HIAT1基因内含子区插入/缺失多态性位点的引物对(例如,P1)。

[0019] 上述山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法在山羊分子标记辅助选择育种中的应用。

[0020] 优选的,所述插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型(II)可以作为提高山羊胸围、胸宽和胸深性状的DNA标记。

[0021] 本发明的有益效果体现在:

[0022] 本发明根据山羊HIAT1基因内含子区插入/缺失多态性位点(参考序列NC_030810.1第7695-7696位)设计引物,以山羊基因组DNA为模板,通过序列扩增、电泳鉴定,能够简单、快速、低成本、精确地检测所述插入/缺失多态性位点的基因型。

[0023] 本发明对山羊(例如,陕北白绒山羊)HIAT1基因插入/缺失多态性位点进行基因型和基因频率分析,对插入/缺失多态性位点与山羊多个体尺性状进行关联分析,结果表明本发明检测的插入/缺失多态性位点能够作为山羊胸宽性状($P < 0.01$)、胸围性状($P < 0.05$)、胸

深性状 ($P < 0.05$) 的分子标记,有利于快速建立体尺性状优良的山羊种群,加快良种选育速度。

附图说明

[0024] 图1为引物对P1扩增山羊HIAT1基因的产物琼脂糖凝胶电泳结果;M表示Marker。

[0025] 图2为山羊HIAT1基因PCR扩增产物测序图,其中:黑色方框标出的部分表示15-bp插入序列:NC_030810.1:g.7695insACTAGTGACTTCTT。

[0026] 图3为山羊HIAT1基因15-bp indel序列分析图,其中:参考序列为NCBI网站上公布的山羊HIAT1基因序列NC_030810.1。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细说明。

[0028] 本发明利用PCR方法对山羊HIAT1基因第7695-7696位点(参考序列:NC_030810.1)突变可能产生的插入/缺失多态性进行检测,并将其与山羊相关体尺性状进行关联分析,验证其是否可以作为山羊分子育种中辅助选择的分子标记。

[0029] 1. 实验药品与试剂

[0030] 1.1生化试剂与生物学试剂:①Taq DNA聚合酶(购自Fermantas即MBI公司);②;蛋白酶K(购自华美生物工程公司)③Marker I(购自天根生化科技(北京)有限公司)。

[0031] 1.2普通试剂:普通试剂从华美生物工程公司购买,为进口分装产品:柠檬酸、柠檬酸钠、葡萄糖、Tris、EDTA、NaCl、NaOH、KCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、醋酸钠、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴化乙锭(EB)、溴酚蓝、二甲基苯氧FF、乙酸、蔗糖、硼酸、琼脂糖等。

[0032] 1.3溶液与缓冲液:所有溶液与缓冲液均采用去离子超纯水配制。高压灭菌条件为15bf/in(1.034×10^5 Pa)、25min。试剂配制方法均参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》。

[0033] 1) 提取组织样DNA所用溶液:

[0034] 除了基因组DNA提取时的公用溶液外,还配制以下试剂:①2mol/L NaCl:11.688g溶于水,定容至100mL,高压灭菌。②组织DNA提取液(100mL):1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)1 mL,0.5mol/L EDTA(pH 8.0)20mL,2mol/L NaCl 5mL,定容至100mL。

[0035] 2) 琼脂糖凝胶电泳分析所用溶液

[0036] ①0.5×TBE缓冲液:取10×TBE 50mL定容至1000mL。②上样缓冲液:含0.25%溴酚蓝以及0.25%二甲苯青FF,溶剂为40.0% (w/v) 蔗糖水溶液。

[0037] 2. 设计山羊HIAT1基因indel引物

[0038] 在NCBI上检索山羊HIAT1基因的序列(NC_030810.1),并利用Primer 5.0设计能够扩增HIAT1基因多个候选indel位点DNA片段的引物,其中能够扩增山羊HIAT1基因第一内含子区域第7695-7696位indel位点的PCR引物对为P1。引物序列见表1(2018年9月设计完成):

[0039] 表1.HIAT1基因候选indel位点扩增引物表

位点	引物序列 (5'to 3')	Tm(°C)	扩增产物大小(bp)
[0040]	F:AGAGCCTCAGTTTCGCTTATT		
P1	R:GAGTTTATGAATCCAGCAGTTGT	TD	183/198

[0041] 参见图2、图3,上述引物对P1对山羊基因组扩增,能够扩增包含山羊HIAT1基因(NC_030810.1:g.7695-7696)的片段。理论上,当7695与7696位之间的ACTAGTGGACTTCTT缺失时,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测之后是183bp大小的带纹;当7695与7696位之间的ACTAGTGGACTTCTT存在(插入)时,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测之后是198bp大小的一条带纹。当7695与7696位之间的ACTAGTGGACTTCTT在一个等位基因上出现插入,在另一个等位基因上出现缺失时,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测之后是198bp+183bp两条带纹以及一条异源双链条带。为此,根据理论分析结果,引物对P1所扩增的对应插入/缺失多态性位点的插入/插入基因型(II)表现为198bp一条带纹,插入/缺失基因型(ID)表现为198bp和183bp以及异源双链条带共三条带纹,缺失/缺失基因型(DD)表现为183bp一条带纹。

[0042] 3.以引物对P1PCR扩增待测山羊HIAT1基因片段

[0043] 3.1山羊耳组织样品的采集

[0044] 实验所用的动物共计491个样本,具体信息见表2。体尺性状数据由保种场或养殖场工作人员测量,采样方式采取个体耳组织样品,这些样品为70%乙醇保存,冰盒低温带回实验室后置于-80℃冻存。

[0045] 表2.采样信息表

	品种	数量	采样地点	时间
[0046]	陕北白绒山羊(SBWC)	491	陕西省榆林市狄青塬陕北白绒山羊原种场	2017年7月

[0047] 3.2组织样品基因组DNA的提取与分离

[0048] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)和参考以下文献:蓝贤勇.山羊重要功能基因遗传变异及其与经济性状的关系[D.]西北农林科技大学博士学位论文,2007,陕西杨凌。

[0049] 3.3琼脂糖凝胶电泳检测DNA

[0050] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)。

[0051] 3.4DNA的纯化

[0052] 参考Sambrook等编著的《分子克隆实验指南》(2002)。

[0053] 3.5分光光度法检测DNA

[0054] 用紫外光光度计测定DNA样品在260nm、280nm处的OD值。计算DNA含量和 OD_{260}/OD_{280} 的比值。如 OD_{260}/OD_{280} 比值小于1.6,说明样品中含有较多的蛋白质或酚,则应进行纯化;若比值大于1.8,则应该考虑去除RNA纯化。

[0055] $DNA浓度 (ng/\mu L) = 50 \times OD_{260} 值 \times 稀释倍数。$

[0056] DNA检测完毕后,取出一定的量稀释至50ng/ μL ,存于-20℃备用,其余的存放于-80℃。

[0057] 3.6PCR扩增

[0058] PCR反应体系采用混合加样法,即根据每一个反应体系所需的各种组分的数量和1次反应所需的PCR反应的个数,算出各种反应组分的总量,加入到1个1.5mL离心管中,充分混匀后瞬时离心,再分装到每个0.2mL Eppendorf PCR管中,然后加入模板DNA,再瞬时离心后进行PCR扩增;PCR反应体系包括2×Taq PCR SuperMix (包括Taq DNA聚合酶、dNTPs和优化的反应缓冲液,浓度为2×) 6.5μL;上游引物0.5μL;下游引物0.5μL (上下游引物浓度为10pmol/μL);基因组DNA (浓度为50ng/μL山羊基因组DNA) 0.6μL;去离子水4.9μL;共13μL体积的PCR扩增体系。

[0059] 3.7PCR反应的程序

[0060] 引物对P1PCR扩增反应程序为:95℃预变性5min;94℃变性30s,68℃退火30s,72℃延伸20s,往复18个循环,每个循环退火温度降低1℃;然后72℃延伸10min,10℃保存扩增产物。

[0061] 4. 扩增PCR产物后琼脂糖凝胶电泳检测分析

[0062] 琼脂糖凝胶电泳检测分3步:1) 制作3.0%的琼脂糖凝胶,使用核酸染料染色,点样4.5μL,点样后120V电压电泳1.0-1.2h;2) 待分子量不同的DNA片段分离清晰时,在BIO-RAD Gel Doc 2000凝胶成像系统成像;3) 根据琼脂糖凝胶电泳结果分析indel多态性;

[0063] 用BIO-RAD Gel Doc 2000凝胶成像系统照相分析,判断indel的多态性(参见图1):

[0064] 对于山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位存在的15bp插入/缺失多态性(15bp-indel),II基因型表现为198bp一条带纹,ID基因型表现为198bp+183bp以及异源双链条带共三条带纹,DD基因型表现为183bp一条带纹。

[0065] 5. 山羊HIAT1基因indel位点的频率统计分析

[0066] 基因型频率是指一个群体中某一性状的某种基因型个体数占总个体数的比率。 $P_{YY} = N_{YY}/N$,其中 P_{YY} 代表某一位点的YY基因型频率; N_{YY} 表示群体中具有YY基因型的个体数; N 为检测群体的总数量。

[0067] 基因频率是指一个群体中某一基因数对其等位基因总数的相对比率。计算的公式可以写成: $P_Y = (2N_{YY} + N_{Ya1} + N_{Ya2} + N_{Ya3} + N_{Ya4} + \dots + N_{Yan}) / 2N$

[0068] 式中, P_Y 表示等位基因Y频率, N_{YY} 表示群体中具有YY基因型的个体数量, N_{Yai} 表示群体中具有Yai基因型个体数量, $a1 - an$ 为等位基因Y的n个互不相同的复等位基因。

[0069] 山羊HIAT1基因15bp-indel插入/缺失多态性位点中的基因型频率及等位基因频率如表3所示。

[0070] 表3. 山羊HIAT1基因第7695-7696位indel基因频率分布表

品种	样本	基因型频率				等位基因频率		哈代-温伯格平衡
		N	II	ID	DD	I	D	P values
SBWC	491	0.051	0.369	0.580	0.235	0.765	$P = 0.586$	

[0072] 6. 山羊HIAT1基因indel位点基因效应的关联分析

[0073] 基因型数据:PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳识别的基因型;

[0074] 生产数据:陕北白绒山羊的体尺性状(体高(cm)、体长(cm)、胸围(cm)、胸深(cm)、胸宽(cm)、管围(cm)、十字部高(cm)共7个性状)。

[0075] 关联分析模型:利用SPSS (18.0) 软件来分析品种,不同因素与体尺性状相关性。首先要对所得数据描述性的统计分析,来确定是不是存在离群值。然后根据数据的特性,利用方差分析、多元线性模型或者t分析进而来分析基因型的效应。在数据处理的过程中,考虑到个体的效应,基因之间的互作以及基因型的效应,采用固定的模型来进行相关分析。此外,根据实际条件来进行取舍,完整模型如下所示: $Y=\mu+G+E$,其中,Y:个体表型记录; μ :总体均值;G:标记基因型效应;E:随机误差。

[0076] 由表4可以看出,在对491只山羊的体尺性状研究中,HIAT1基因15bp indel多态性对胸宽性状有极显著影响($P<0.01$),对胸围和胸深有显著影响($P<0.05$),II基因型个体性状优于ID和DD基因型个体;ID基因型个体性状优于DD基因型个体。因此,山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性位点可作为山羊胸宽、胸围和胸深性状的DNA分子标记。

[0077] 表4. 山羊HIAT1基因15bp indel与陕北白绒山羊体尺性状关联分析 (Mean±SE)

位点 P1	生长性状	基因型			P 值
		DD	ID	II	P Value
[0078] SBWC (n=491)	体长 (cm)	65.26±0.35	65.35±0.45	67.54±1.65	0.456
	体高 (cm)	58.83±0.28	58.32±0.34	60.02±1.04	0.187
	胸宽 (cm)	19.19 ^B ±0.34	20.73 ^{AB} ±0.42	22.00 ^A ±0.34	0.001
	胸深 (cm)	29.47 ^b ±0.23	29.65 ^{ab} ±0.24	31.69 ^a ±1.08	0.033
	胸围 (cm)	88.74 ^b ±0.54	90.10 ^{ab} ±0.67	93.83 ^a ±2.03	0.019
	管围 (cm)	8.27±0.22	8.16±0.06	8.20±0.14	0.930
	十字部高 (cm)	63.36±0.31	63.30±0.40	65.46±0.81	0.180

[0079] 注:a,b: $P<0.05$;A,B: $P<0.01$

[0080] 结果表明:山羊HIAT1基因15bp-indel位点的不同基因型,在陕北白绒山羊中对胸宽、胸围和胸深都具有显著关联。

[0081] 总之,本发明利用PCR扩增方法检测山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性位点,并将其与陕北白绒山羊的生长性状(体高、体长、胸围、胸深、胸宽、管围、十字部高共7个性状)进行关联分析,发现其可以作为山羊分子育种中辅助选择的分子标记位点,从而加快良种选育速度。本发明所建立的山羊HIAT1基因NC_030810.1:g.7695-7696位15-bp插入/缺失多态性位点的检测方法,为利用indel实现山羊生长性状的

标记辅助选择 (MAS) 应用提供理论和实践依据。

- [0001] <110> 西北农林科技大学
- [0002] <120> 一种山羊HIAT1基因插入/缺失多态性的检测方法及其应用
- [0003] <160> 3
- [0004] <210> 1
- [0005] <211> 21
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213> 人工合成
- [0008] <400> 1
- [0009] agagcctcag tttcgcttat t 21
- [0010] <210> 2
- [0011] <211> 23
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> 人工合成
- [0014] <400> 2
- [0015] gagtttatga atccagcagt tgt 23
- [0016] <210> 3
- [0017] <211> 15
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> NC_030810.1: g. 7695-7696插入/缺失序列
- [0020] <400> 3
- [0021] actagtggac ttctt 15

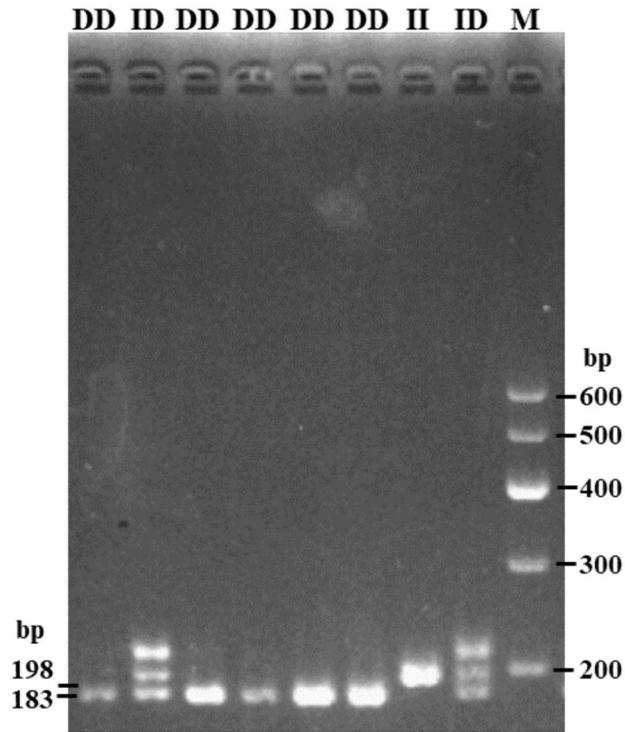


图1

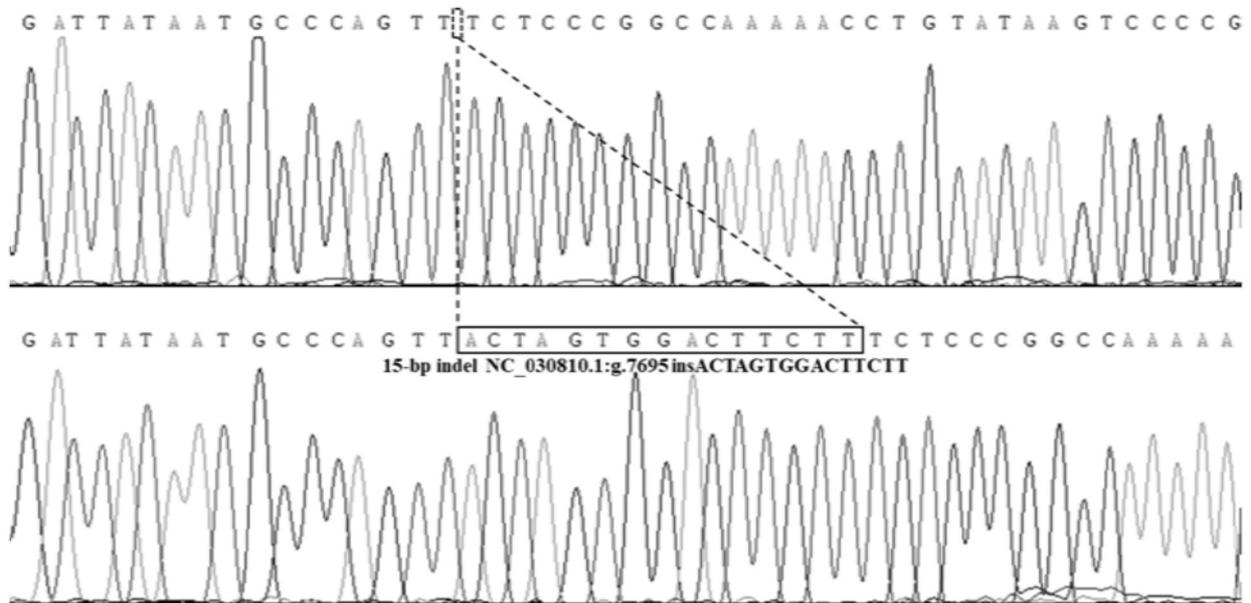


图2

上游引物

测序序列: AGAGCCTCAGTTTCGCTTATTCCTTATGCTTTTCTCACATGGTAACATCCATTTA
参考序列: AGAGCCTCAGTTTCGCTTATTCTTATGCTTTTCTCACATGGTAACATCCATTTA

测序序列: ACAAGTAGGATTATAATGCCCAGTTACTAGTGGACTTCTTTCTCCGGCCAAAA
参考序列: ACAAGTAGGATTATAATGCCCAGTT_____15bp 插入_____TCTCCGGCCAAAA

测序序列: ACCTGTATAAGTCCCGATTGTTGATAGGACTGTAACGTAAGTTATTACAGTC
参考序列: ACCTGTATAAGTCCCGATTGTTGATAGGACTGTAACGTAAGTTATTACAGTC

测序序列: AGTATTCTCCATAACAACCTGCTGGATTCATAAACTC
参考序列: AGTATTCTCCATAACAACCTGCTGGATTCATAAACTC
TGTTGACGACCTAAGTATTTGAG 下游引物

图3