

说明书

检测黄颡鱼杯状病毒-1 的特异性引物、探针及快速检测试剂盒

5 技术领域

本发明属于靶 RNA 片断的快速检测领域，具体地说，涉及一种检测黄颡鱼杯状病毒-1 的特异性引物、探针及快速检测试剂盒。

背景技术

- 10 黄颡鱼杯状病毒-1 (Yellow catfish Calicivirus, YCCV-1) 是黄颡鱼潜在的致病性病原。其对黄颡鱼具有一定的致病力，常引起黄颡鱼体表出血、肠炎，少数病鱼肝脏有出血点。其引起的疾病对黄颡鱼养殖产业危害较大。YCCV-1 为单链 RNA 病毒，属于杯状病毒科，未确定属的分类地位，通过基因组比较发现，与该病毒基因组同源性最高的病毒为日本海鳗杯状病毒
- 15 (Conger japonicus Calicivirus)，同源性为 38%，表明黄颡鱼杯状病毒-1 是一种全新的病毒，与已知杯状病毒科中的其它任何病毒都不同。该病毒由发明人于 2018 年 6 月从黄颡鱼中分离所得，其基因组也由发明人首先获得，其基因组包含两个编码框，全长为 7149bp。我国是黄颡鱼养殖大国，黄颡鱼病害发生率影响着广大鱼民的经济收入，近几年来，由于黄颡鱼病害
- 20 的频发，已给广大养殖户造成了巨大的经济损失。黄颡鱼杯状病毒-1 在国内外未见报道，该病毒至今也未有检测试剂盒和检测方法报告，这严重阻碍了该病毒引起疾病的预警与预防工作，因此，对该病毒检测试剂盒的开发和检测技术的研究迫在眉睫。

25 发明内容

有鉴于此，本发明针对上述问题，提供了一种检测黄颡鱼杯状病毒-1 的特异性引物、探针及快速检测试剂盒，本发明的引物、探针和试剂盒特异性强，敏感性高，能实现快速、有效且准确检测黄颡鱼杯状病毒-1；本发明

中的试剂盒为荧光定量检测试剂盒，该试剂盒在封闭的情况下判断结果，扩增产物不会对检测环境造成污染，可用于黄颡鱼杯状病毒-1 病的监测和早期预警与预防。本发明采用荧光定量技术，通过检测黄颡鱼杯状病毒-1 的衣壳蛋白基因，来检测黄颡鱼杯状病毒-1，这是目前国内外首次研制的检测黄颡鱼杯状病毒-1 的试剂盒；该试剂盒的研制为黄颡鱼杯状病毒-1 病的监测和预防奠定基础。

为了解决上述技术问题，本发明还公开了一种检测黄颡鱼杯状病毒-1 的引物探针混合物，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，探针 B 的 5' 端标记有荧光报告基团，3' 端标记有荧光淬灭基团。

- 10 进一步地，引物组 A 包含引物 YCCV-1-q183F 和引物 YCCV-1-q183R；
引物 YCCV-1-q183F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；
引物 YCCV-1-q183R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；
探针 B 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

- 15 进一步地，荧光报告基团选自 6-羧基荧光素、六氯-6-甲基荧光素、VIC 荧光染料、四氯-6-羧基荧光素、羧基-X-罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、磺酰罗丹明、6-羧基-4'，5'-二氯-2'，7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯、花菁 3、花菁 3.5、花菁 5 和花菁 5.5 中的一种或几种；所述荧光淬灭基团选自 6-羧基四甲基罗丹明、4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸、黑洞淬灭剂 1、黑洞淬灭剂 2 或黑洞淬灭剂 3 中的一种或几种。

- 20 本发明还公开了一种黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒，包括特异性引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B。

进一步地，Taqman 荧光探针 B 核苷酸序列 5' 端标记 HEX，3' 端标记 BHQ1。

- 25 进一步地，该试剂盒还包括独立包装的病毒核酸提取液、一步法 RT-qPCR 反应液、阳性质控品、阴性质控品，其中病毒核酸提取液为含有 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.5%十二烷基肌氨酸钠、0.1 mmol/L β 巯基乙醇、25 mmol/L 柠檬酸钠、20 μ g 糖原、pH8.0 的缓冲液，一步法 RT-qPCR 反应液为探针法荧光定量一步法 RT-qPCR 反应液，阴性质控品为灭菌生理盐水，

阳性质控品是含有黄颡鱼杯状病毒-1 衣壳蛋白基因的载体。

本发明还公开了一种由上述检测黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒在检测黄颡鱼杯状病毒-1 中的应用，包括以下步骤：

待检样品使用病毒核酸提取液提取病毒 RNA，分别加入到引物探针混合液，再加入一步法 RT-qPCR 反应液，混匀后进行荧光定量 PCR，反应条件为 42℃ 20 分钟，95℃ 条件下反应 5-10 分钟；然后 95℃ 反应 5-15 秒，60℃ 反应 20-45 秒，共 38-42 个循环；荧光信号收集时设定为 HEX，荧光信号收集设在 60℃；

结果判断：如果检测通道没有出现 S 型扩增曲线，判为黄颡鱼杯状病毒-1 阴性；如果检测通道出现 S 型扩增曲线，Ct 值 ≤ 35，则黄颡鱼杯状病毒-1 别判定为阳性。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 采用本发明的引物组对黄颡鱼杯状病毒-1 进行检测，因为特异性高，所以可以根据是否扩增就能判断目标基因的存在与否；

2) 本发明的快速诊断试剂盒是利用荧光定量技术快速检测黄颡鱼杯状病毒-1，检测灵敏度高，扩增模板仅需 25.8 个病毒拷贝；

3) 本发明的快速诊断试剂盒扩增快速且高效，在不到 1h 即可完成扩增，且效率高；

4) 本发明的快速诊断试剂盒操作简单，采用病毒核酸提取液对病毒核酸进行提取，对检测人员的技术素质要求较低，可建立成本低廉的快速筛选体系，实现现场高通量快速检测；

5) 本发明的快速诊断试剂盒不但使得黄颡鱼杯状病毒-1 定性检测更加简便快速、特异性高、灵敏度高，而且该试剂盒是检测黄颡鱼杯状病毒-1 的第一个试剂盒，填补了黄颡鱼杯状病毒-1 无检测方法的缺口，具有很高的科研和经济价值。

当然，实施本发明的任一产品必不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

5 图 1 是本发明黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒特异性检测图；其中，1：嗜水气单胞菌； 2：鲫鱼疱疹病毒病毒；3：鲤鱼浮肿病毒；4：黄颡鱼动脉炎病毒 5：草鱼出血病病毒；6：锦鲤疱疹病毒；7：黄颡鱼杯状病毒-1；NTC：正常黄颡鱼 RNA 阴性对照；

10 图 2 是本发明黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒灵敏度检测图；其中 1-8 分别代表 2.58×10^7 copies、 2.58×10^6 copies、 2.58×10^5 copies、 2.58×10^4 copies、 2.58×10^3 copies、 2.58×10^2 copies、 2.58×10^1 copies、 2.58×10^0 copies。

具体实施方式

15 以下将配合附图及实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。下述所用到的试剂和材料若非特殊说明均为本领域人员的公知常识。

实施例 1

20 检测黄颡鱼杯状病毒-1 的引物探针混合物，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，探针 B 的 5' 端标记有荧光报告基团，3' 端标记有荧光淬灭基团。

该引物组 A 包含引物 YCCV-1-q183F 和引物 YCCV-1-q183R；

所述的引物 YCCV-1-q183F 序列如 SEQ ID NO：1 所示；

所述的引物 YCCV-1-q183R 序列如 SEQ ID NO：2 所示；

所述探针 B 的核苷酸序列如 SEQ ID NO：3 所示。

25 其中，荧光报告基团选自 6-羧基荧光素、六氯-6-甲基荧光素、VIC 荧光染料、四氯-6-羧基荧光素、羧基-X-罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、磺酰罗丹明、6-羧基-4'，5'-二氯-2'，7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯、花菁 3、花菁 3.5、花菁 5 和花菁 5.5 中的一种或几种；所述荧光淬灭基团选

自 6-羧基四甲基罗丹明、4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸、黑洞淬灭剂 1、黑洞淬灭剂 2 或黑洞淬灭剂 3 中的一种或几种。

更优选地，按照下表 1 所示来选择荧光报告基团和荧光淬灭基团。

表 1

荧光淬灭基团	荧光报告基团
DABCYL	6-FAM、TET、JOE、HEX、Cy3 中的至少一种
TAMRA	6-FAM、TET、JOE、HEX 中的至少一种
BHQ1	6-FAM、TET、JOE、HEX、Cy3 中的至少一种
BHQ2	TAMRA、Cy3、ROX、Texas Red 中的至少一种
BHQ3	Cy5 或 Cy5.5

5 最优选地，所述荧光报告基团为 HEX；所述荧光淬灭基团为 BHQ1。

实施例 2

黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒，包括独立包装的病毒核酸提取液、一步法 RT-qPCR 反应液、阳性质控品、阴性质控品和引物探针混合液。

10 引物探针混合液，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，其中引物组 A 上下游引物终浓度均为 0.15 μM ，探针终浓度为 0.1 μM 。

Taqman 荧光探针 B，其核苷酸序列 5' 端标记 HEX，3' 端标记 BHQ1；

阴性质控品为无 RNA 酶的灭菌生理盐水；阳性质控品是以提纯的黄颡鱼杯状病毒-1 基因组为模板，由引物组 A 进行 RT-PCR 扩增，扩增产物连接载体，经基因测序确认正确后包装所得的假病毒；

15 所述的病毒核酸提取液为含有 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.5%十二烷基肌氨酸钠、0.1 mmol/L β 巯基乙醇、25 mmol/L 柠檬酸钠、20 μg 糖原、pH8.0 的缓冲液；

所述的一步法 RT-qPCR 反应液为探针法荧光定量 RT-PCR 反应液，含有 AMV 逆转录酶、PCR 酶、dNTP 和 Mg^{2+} 。

20 实施例 3

黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒进行应用，取 0.05g 待检样品加入 1 mL 病毒核酸提取液进行充分研磨，12000 r/min 离心 10 min，取上清 800 uL，加入 400 uL 乙醇，室温 5min 后，12000 r/min 离心 5 min，沉淀用 75% 乙醇洗一次后，室温干燥 5min 后，加入 50 uL DEPC 水溶解 RNA，取 5uL 加入到反应管中，再加入引物探针混合液 2uL，再加入一步法 RT-qPCR 反应液 10 uL，加 DEPC 水 3 uL，混匀后进行荧光定量 PCR，反应条件为 42°C 20 分钟，95°C 条件下反应 5-10 分钟；然后 95°C 反应 5-15 秒，60°C 反应 20-45 秒，共 45 个循环；荧光信号收集时设定为 HEX，荧光信号收集设在 60°C ；

结果判断：

- 10 如果检测通道没有出现 S 型扩增曲线，判为黄颡鱼杯状病毒-1 阴性；如果检测通道出现 S 型扩增曲线，Ct 值 \leq 35，则黄颡鱼杯状病毒-1 别判定为阳性。

- 15 本发明所述的引物组 A 和探针 B 是针对黄颡鱼杯状病毒-1 衣壳蛋白基因进行设计的，采用特异性探针的荧光基团捕获来进行结果检测，具有灵敏度高，使用方便的特点，也是国际检测用试剂盒的通用标准。

实施例 4 黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒的应用例

(1) RNA 抽提：

- 20 取黄颡鱼肝脏或脾脏组织 10-20mg 于 1.5mL 离心管中，加入 1 mL 病毒核酸提取液进行充分研磨，12000 r/min 离心 10 min，取上清 800 uL 到新的 1.5mL 离心管中，加入 400 uL 乙醇，室温 5min 后，12000 r/min 离心 5 min，沉淀用 75%乙醇洗一次后，室温干燥 5min 后，加入 50 uL DEPC 水溶解 RNA，备用。

(2) RT-qPCR：

- 25 在 8 个反应管中分别加入 RT-PCR 反应液 10 μ L，引物探针混合液 2 μ L 配，DEPC 水 3 uL，制成反应体系，然后分别加入 5.0 μ L 待检模板。

荧光定量 PCR 反应条件：42°C，20 分钟；95°C，10 分钟；95°C，15 秒，60°C，45 秒，40 个循环。

采用 LightCycler 96 System 荧光定量 PCR 仪，荧光信号收集时设定为

HEX 荧光素，荧光信号收集设在 60°C。

每批次反应均设置阴性质控品（灭菌生理盐水）、阳性质控品（黄颡鱼杯状病毒-1 假病毒）。

5 (3) 结果判断：检测通道没有出现 S 型扩增曲线，判定为黄颡鱼杯状病毒-1 阴性；如果检测通道出现 S 型扩增曲线，Ct 值 \leq 35，则黄颡鱼杯状病毒-1 别判定为阳性。

结果验证：将检测阳性的扩增产物进行基因测序，测序结果应与黄颡鱼杯状病毒-1 衣壳蛋白基因序列一致。

10 采用上述黄颡鱼杯状病毒-1 荧光定量检测试剂盒和方法进行快速检测黄颡鱼杯状病毒-1 特异性和灵敏性试验结果分别如附图 1 和附图 2 所示。

图 1 黄颡鱼杯状病毒-1 特异性检测图，如图所示，经 Real-time RT-PCR 定量检测后，仅黄颡鱼杯状病毒-1 具有特异扩增曲线，其它病毒和细菌都没有出现扩增曲线，表明该方法特异性良好。

15 图 2 黄颡鱼杯状病毒-1 灵敏性检测图，如图所示，经 Real-time RT-PCR 定量检测后的黄颡鱼杯状病毒-1 RNA 系列稀释的扩增图，当反应体系中加入 25.8 个病毒拷贝的 RNA，扩增显色结果就为阳性。

20 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。

序 列 表

序列表

	<110>	浙江省淡水水产研究所	
5	<120>	检测黄颡鱼杯状病毒-1 的特异性引物、探针及快速检测试剂盒	
	<160>	7	
	<170>	PatentIn version 3.3	
	<210>	1	
10	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工合成	
	<400>	1	
	TCTCAACACACGCAAATGCT	20	
15	<210>	2	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工合成	
20	<400>	2	
	GAAACTCGTCGCGTCTTGAA	22	
	<210>	3	
	<211>	41	
25	<212>	DNA	
	<213>	人工合成	
	<400>	3	
	ACAACTGGGCAACTAAACCCATCCACT	22	

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

5 <213> 人工合成

<400> 3

TTATTACTATGTTCTCTAAACATTCTAATATACAATCTAATCAGAATCCTGATGAGTTTGATTTCGCTTCCGC
GAACTCAACTCACAGATTCTTTGTATGGCCCTGATGGCCATCCTTTAATTTCAAACCTGGCTTGATTGTTAATACC
ACAATGACAAATGTCAAGCCAGCAACTCTAACCTCGACTATTCTGAGGTTGTGCGAGGCTTACTCCCATTGGGAGTG
10 GCTCCGCGAGTTGGCATGTATTTATGAGATATATGGTCCAGTTATCAAGGATTACTGGCCAGCTATCCAAGAACTCT
TCACTTTCCTTCGTCTCAATATTATAGCCAAAACCTGGTGGTGGCTCCACCAGTGAGACTGAGGAAGATGGGGATACA
TCTCCGCAAATGCATGCTAATGAAAATAAGCCAATTTATGTCATGTCAAACGACCCTGAAGATCCGCGATTTCAGTAC
TTTTGTTTCGGTTTTTTGAAAACCTTCCGAACTGTTTCTGATCGTTTTGACGCGAGCTACACTGTTGTTTACATCTTCT
TTGAGGTGGCTGACGCAGATAGTGACCTTCAAACCTGGGTCACTGACCCGGATTATAATCCGGCTTACACTGTGTTG
15 TATGTCACCTCGAAGACAGCTCTTCTTGACATGACGAAGTGGGGCCCAAGCACCTCGTCGGTTTTTTATCTCTCTGG
CGAACTCTCGGAGAAGACACATCCAGGAATTGTGACACTTCTCCGTACTGGCGTTACAACACCTGAGACTGAGGATT
GGCGAGTGAAAATGCGCAAGTTTTTCTCGCCGCTTGGGATGGGTCAAAGGCTTGCGTGATCTCGATGGCCTCAGCT
ATCTTCACTGGTCTCGCGCTCTTGGCTTCCATTTTCCCTGGTGTAAGTGGGCGAAGACCATTTTGGACCGGTTGAT
GGGAGTTTTGAGCGTTGGATCGAAGGTCAGAAAGTGCCAAAGGCGATTCTCTGATTTTCTTTGATGCCGTGAAAGAGA
20 CTGTGAGATCACGCTCGGTGAAGCTCACACCGAAGCCATCCAACCTTGAGGTCACTTGGATGAACGAACTCTCGCGT
CGCTGTAATCTTGATCCTCGGCTCCTGGACCACCTTCTTTTTCCACGTGAGCGTCTGTACAAATTAATGAGGGATTT
GGAAGTGAGGATCGCGAGGGAGAAATCTGGTGGTTTGTGAGCTTATTACAGGAGTCATCTGACCATTTGCCAAGAGC
TAATGAATAAGCGAGACGACACACTTTGTAAAAACCCAGTCCGGATGAAACCAGTTGTTGTGGTTTTGGCCGGTGAA
CCCGGAGTTGGCAAGACGACTTTTGTGAAATCTCTCGTTCAAGAACTTGAGCCAATACTCCACACGAGCGGCTGGGA
25 CACTTGGATGTGCGGTGCGGATCATCACGATGAAATTACAGGCAAACCCATATTGGTCATGGAGGAGTTGGGTCTTA
AAGATTTGGAGGCCGATATGAAGGAATTTCAACGTCTCGCAGACACTGCACAATATGTCGCCAATAATGACCAAATC
CAGAATAAGACCCGCCGCGAAGCTCCAAGTGTAATAATTGTCACCACAAATAAGCAGAACCTCTGGAAAAAACATTC
AGAACCTGATGCTTTAATCCGCCGGGTTGATTTCCATTTCCATGTAACCCATGATGGGTTAGAACAATGGAAGGGGG
CCAATCCTGGATTGGTTCCACCAGACAAGGTTTTGAAGAAGCTCTTTGCGGTTGATGGGCCAAGGTTTGGTCAATTA
30 CCGGCTGGAGCAGTAGATTGGAAGGGCAACTTTGCGGCTTTTGGCCAGCGTGGTTGCATCACACCAGTTTTTAAGAC

CACCAACACAATCACAAAGAACATCAAGATCCGGTTGCGCTCTCGAATGAGCGAATTCATTGGCACTGGTCCTCAGA
 TTCCACTCTGTTTCCATGCTGCACTTGATGTCCCATCTTTGTTTTCCGGGGCCACCTGGTTGCGGAAAGACAACA
 CTAGCGAATGATTTCACTAGTGTCTTTACTGTGATCAATGACCCCTGGGTGACTGATGCAGGCTGGGATGATTGTTA
 TAACCAAATCATGACTGCTGAATCAACGGCTCGTGTTCCAATGATAATCACAACAAACAACGAGCCCTGGGAAGAGC
 5 GTTTGAGTGAGATGGGTAGTGATGCCCCGCGGGCCTTTGAACGTCGTGTTATCTACCTAGATTTTGACTTTACCAAG
 AAAGGTTATTTCTATGGTAGGTACACTGTCACTGATATTCTGAACATGGTTGGTTCGAAGTGTGTCAAGATCGTGCA
 CGACGGACAAGCTATCAGTAGGCTTGATGTCATATCCATGATCAAAGATGCGTGCCCGCAAGAGAAGGAAACTACCA
 ACATGAAGGTGCCTACCCATAATGAGCAGAATCCACTAATAGCATACACATCACTTACCGTTAAACAGATAACTCTC
 AATCCAGGGATTTGGAAACTTGTCTCATCTTTCACCATTGTAGACCGCACTTTTCCTTTGAAAGAAGCCTTAATGAA
 10 AATCTCCAAACAGGTTGAGTTGAGCCCTCTTGGTCATAGCGGCCCTGATTCTCTGTTATAACAATTAATGATGCCA
 AAATCCGCCTTAAGATCCCTCCCGGAAGTATTCAGTTTGGTGATGGTATCATCAATCTGTTTACTTTTCGATGGGCTT
 CTAACAGCAGCAGTAGTCCAACAAGAAGATGAGGCCCTGTGGACATAATAATTCGTCCCAGGAGACAGATACCAAA
 TTCAATCTGGCAACTTGTTATCAATGTGACAGCATCAACAATTGGTGTCGTCTCGGCGTGTATGGCGAGCTTTCGCC
 GTTTTGACGAGTCTCCTACCGATGAGGAGGAGGAGTTCGCTGAGCGGCGGAGGCCGGTCGCACGCATTAGACAGAGT
 15 GACATGACTCTGAAGAATGCCGCAATCCAAATTTGTGGAATGCAACAAGTTGGGGTGATGAAATGGAGGAAAAGTGA
 CCCAATCATGCTCCACACTGTGGAGTCCTTGCGGACCAGTATTTTGCCGGTAACGGCGGAAAAATGGGGTCCGCAAGG
 GCTGGGCGTTCTCTCATGAGTCGGGGATAGTTGTCAATAGTCATGTCATCTCATCTGGCTGCCGGGTGGCCCTCGA
 ACAGTTGGGCCCTGTAAACAACAGTTGTGAAAACTCTGATTTTTGTTTTCTCCATCCCCAGGCCGATCCAGGATA
 CAAGAAATGTAAGGCACCTTTCACCATTCCCTATGTTGGTGAAAAGATCACTCAAGTTGGTTTCGATGGTAGTCTCA
 20 AGGTTGCCCAGTCGTGAAAAACAGAGCCTAGTCATCAGTGGGACACCGCGGGTGGTTTGGCTAGCAGACATCATT
 GAGAAACCACAGGGTAGTGAGAAATCTATCCCGGGTGATTGTGGCCTTCCTTGGGTCAGACAAATTGGCACCAATTA
 TGAAC TTGTTGGGCTTCACACTGGCATTATGGGACAATGATCATGGTGACCCCTGTTCCATTGATGCCATCAGAGC
 ATGGTGCAACTTCTAAGAATAAGACCTACCTCTATCGCACTCAGTATTTTGGGATAGAAGAAAAAGTTATTGACATG
 AAACCAGCCCCAAAATGCGGGGTTTTCAATGGAGTGGAAGAGGATTGTGAGATGCTGATACGTCGGTGTCTACAACC
 25 CTTTTATGAAACTCCGAACCCCGCTTTTGCATCTCAAGAAGCCTTCCAAGCGACGTGTGATTATATCGCTATGAAAG
 TCAATAAACCCAAACGGTGGTCGATCATCGCCGCCGTAAAATCTCTAGACCAAACAACATCAGCTGGCCCAGCGTAT
 GGTGTGACAAAAGACAAAGTCTTCAACCCGGATGGGTCTGTCAACCCACGTTATGCAGGAATTTGGCGAACTGGGTT
 GAGGGGTCCACCAGATGCCGGGTGTAAAGTTCATATCAAAGATGAGATGAGACCACGTCGGAAGTATGAGGGTGGTA
 ACTCCCGACCCATCTTTTGTTCACGTCCACGCGGTTGCGCGTGTGAAAGCCCTTATGGGTGATTTGTTGATGCAG
 30 TTGATGGAGACGGTGGGTGACCACCCTTATGCGGTGGGTGTTGCTCCTGGAAC TGGGACGTGGCACAACATTGCCAA

GGAGCTTGAAAAATGGCCAATTTTGGTTGATGCAGATTTTCAACGTTGGGATTCATGCATCGGCCCAAATTTGATGA
AACAAGCCTATATGGCCCTGACGCACCCTCTTGAACCTGAGGATCGCGACAGGGCACGTATTGACTATGCAACAATT
GTCCACCCAATCACTCAATTTGGCCCAACAAGATGTGGTCTCCCTAGTGGCATTGTGGAACATCCCACTTGAACGT
TACAGTCCACTTGCTACTGGTGAATGACACCTTGATTGTAACAACAAGCCTTGCCTTGGGGAACAGGCTGCCCCA
5 TAGCATTCTTTTGCTATGGAGATGACTTCGTGGCTGGGGTCAAGAACAGTGAAACCCCTTCAGATGCTCATTGAAGGG
TGGAACGTTTATGGGTTCATGCCACTAACGCAATGAAGACTGGACCTCCAGAAGCAACACGTCTGGAAGATATCCG
TTTCTTGAAACGGGCATTCAAAAAAGACGAGAGTGGGTCTACCGAGCCCCTCTTGAAGAGTCTAGCCTTTGGCGCG
CCCTCAGTTTCTCCCGTCAACACGTCTCATAAGATTACACGGGGGAAATGGAGGTTGCGCCATTGTCGGGGGTTCGT
CACACTTCAATTTTGCAAGCAGTACTCAGTGAAGCTTGGCAACATGGTGAAACAGGGTACAAGAAGTGTGCTGATCG
10 ACTAATTAAATGGTCCAAAAAGGTCCATGAACGTTTGCCGATCGCGATTCTCCTTATTCAAGGTTCCAACCAAGTG
AAATTCTCTGCGGATCTGATCAATTATCTTTTCTGACAATTCTCATCCAAGCTTTTCTGTGTTCCACATTCAAAC
GAAATGGACGCTCCAATGGTTGTTGATGTTCCCGCCACTGGCGAAAACTCAGGGTTGGTTGTTGGGCCCCGTGGGGGC
GGTAGTCCCTGTGGCTGCACCAACAGTTGGCGCTGAGACAATGGCTGGTATGACTGGTGGAACCTGGCGGTTGTATTG
ACCCAGCCATACGTGGCAAATTTGTAGTCGTCCAGGCGGAATTGTCTCGGTTAGCACCGAAACTGTTCCAGGAACG
15 AAGATCTTCCAAATTAAAGTTGAGCCAGGCATAAACCTCTATACAGTTATTTGAAGGCAATGTACAATGCTTGGGC
TGGCGGTTTCAAGATTATGACCGTAATTGGTGCAAACAACCTCATTGGCGGGAAATTCCTCATCGTTTTACGCCAC
CTCAAATCAACCCTGAAAATTATCACTTGAAGCTCTTACCGGTTTCCCTTCTGTCTCTTGGATATTGCTGAAATG
GACAATGTCATATTGGATTGCACCGACATAAAGCGTGTAATGTGGCATCCCACTAACGACAATTCGACTGATGGCTT
TGCTGGGTGGTTTTCTGTTTTACCTTAGTTAACTCAACACCGCTGGAACCTGGACCAATCACTTTGGATCTACGTT
20 TCTTCTCAACACCAAGCGACAACCTTAATTTGAAATGTTGATCCCCCTGTAGAAGTTGGGGCAGGAGCGCAATTG
GAGGTCTGGGCAGCGCTTGAGGGAAACAATCTTTCACTCCCTGGGACCCAAGCGAGGGATGGCTCCCCCACTGAAAC
CCTTATCGCACTTTCAAAGAACGCGAGTGTTGTTACGGGGAATATGTGGGCTGGGGTCAACCCCTTTGGTTGGTACAC
CAGTTGGTGCCATTCCGTCCGAGGTGTTTCGGGTGGCTACCCAGTTAAGCTCTTGGCCACAGGTGTGGCAATGAG
TACTGGGTGGCATGTCTCGACGCTGATGGTAACATCTGGGAGGATGACACACAGGGTTCTGCCAATCTGCCTGAGTT
25 TTGGCCCTCATCAGCCCCGTTAATTGGAGCTGGTGTGGCAGTGAAACGGTGGTCAGCAACGGGAGACGCCGAGTGA
CTTTAGGCACCTGGAAGCCCCAAACATCTGTGGGGATAATCAAACCAAGAGTCTCAATGACCAGTGGCGTGTCAAGT
TCAATCACTTACATGCTATACTGGATTCCAGACACAATTATGAACAATCAATCAGGAACCTTTCAAGCCAGTGTATAC
CCCCCAATGGGGAGAGCCTCGTGGTGTATGGTGGTCCGGGAGGACTTAACCTTACATCATTGAGTTTGTCAACAA
TGGAATCAATGTACTACCGCAAGAATAAGCCCCGGTTGGACCGGGAGAAGCCCTCCTCTTTGCAGTCAAAGACGCC
30 ACAACTTTAACTGTGATGCAGGTGAAACTTCACTCCAATGGCGTTCTAACCCTGGTGGTGTTCACGGCAGTTCA

ATGGATGGCTCCAATAGTCTTCACCTATGTTGGTGTGCTCTCTGAGAACTATCTGTTGAACCCACCAGCTGGCGGGA
CGTCATCAAGTCTTCTTGACCTAACAGAACGCATCACAGAATGGCAGGGGCAGCTATCGGAGCACAATTGGGATCCT
CAATCATCGGAGGCGCTTTCCAACCTGGCTCTGCTGCTCTCGGAGGCAAGATTGCAGCCGAGAACAACCTCCAGCTC
CAGTCACGTGACCAGTCGTATGGCTTGCGGCTACTCTCCGACCACAAATCGGAGCTTAGCCAGGCAGGCTTGCCGAC
5 GTACTTGGCATACTCTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATTAGCTAGCCAAAAATACATGATCAAATCAGGCTATGGCA
TGAGTGTCTCAACACACGCAAATGCTCCAAATTCATTCACTTCATTAACAAATTTCTCAGGCACAACATTAAAGAAA
TCAAATGTTAAGAAAACAACTGGGCAACTAAACCCATCCACTACAAATTTTGAAAACCCAAATTATGGTATCCAAAT
GAGCAATGTTAATTATTCAAGACGCGACGAGTTTCCGAAAGTTTACTTTACGGGATCGCCGAATCAACTGTTTAAA
TTTTTACTTGTGTTATTATCTTTTAAATTTTGTAATCATTAAATGCATGCTTAATAGTAAATTAATCCGT