

实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、判断槟榔幼苗缺锌状态的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，尤其涉及一种实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、判断槟榔幼苗缺锌状态的方法，尤其涉及一种通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法。

背景技术

目前，锌（Zn）是植物生长所必需的微量元素，对植物的生长和代谢具有不可替代的作用。锌离子主要作为蛋白质的复合物和多种蛋白质的激活剂存在，参与多种生命活动，包括碳水化合物代谢、蛋白质合成、细胞膜完整性的维持、生长素合成的调节和花粉的形成。植物还需要调控和维持耐环境胁迫所需的基因表达，如高光强和高温。如果过量使用，可能会有潜在的毒性。过量的 Zn 则因其不受调节的高亲和力而与生物分子中的硫、氮和含氧官能团结合。

荧光定量 PCR 是 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种新的核酸定量实验技术，它的原理是通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针，对 PCR 产物进行标记跟踪，实时监控反应过程，通过对产物量的实时分析，最终能够对模板的初始浓度，核酸种类、基因突变类型等信息作出准确的判定。目前，荧光定量 PCR 在生物学研究及个体化医学基因检测领域有着广泛的应用。

ZIP 是一个在植物锌的转运中起重要作用的基因，响应植物缺锌，在水稻、玉米、小麦等植物中都得到验证。ZIP 基因家族在缺锌的情况下可能会出现差异表达的现象，但现有技术中关于通过 ZIP 基因家族差异性表达来判断槟榔幼苗缺锌状态的方法尚未见报道。因此，亟需一种可以通过差异基因的表达来判断槟榔幼苗是否处于缺锌状态的方法。

通过上述分析，现有技术存在的问题及缺陷为：现有技术中没有详细的通过分子水平来检测槟榔缺锌的状态，多以生理生化指标来检测槟榔是否处于缺

锌的状态，并且关于通过 **AcZIP** 基因家族差异性表达来判断槟榔幼苗缺锌状态的方法尚未见报道。

解决以上问题及缺陷的难度为：需要通过多个方面来验证槟榔 **ZIP** 基因会响应槟榔的缺锌，之后通过响应的程度挑选变化程度相对显著的基因，并且可以与槟榔其他金属离子的变化趋势不一致，来区分特异响应槟榔缺锌的 **ZIP** 基因。

解决以上问题及缺陷的意义为：通过分子水平上 **ZIP** 基因的响应情况，反应了槟榔的缺锌的状态，更为准确的说明了槟榔在缺锌情况下的分子响应。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种通实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、判断槟榔幼苗缺锌状态的方法，尤其涉及一种通过荧光定量 PCR 技术，利用在缺锌中差异表达的基因，来检测槟榔差异基因表达水平的试剂盒及应用。

本发明是这样实现的，一种通过 **AcZIP** 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法，所述通过 **AcZIP** 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法包括以下步骤：

步骤一，实验基地进行槟榔缺锌的处理；

步骤二，进行样品的采集；

步骤三，进行 **ZIP** 家族分析；

步骤四，进行引物设计；

步骤五，进行引物的特异性验证；

步骤六，进行实时荧光定量 PCR 检测。

进一步，步骤一中，所述实验基地进行槟榔缺锌的处理，包括：

在实验基地以 **Hoagland** 为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁和缺锌的处理，每隔一周时间进行培养液的更换，直到槟榔幼苗出现明显的表型；其中，缺锌的槟榔幼苗的新叶呈网格状的黄化现象。

进一步，步骤二中，所述样品的采集，包括：

对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用 75%的乙醇擦拭干净，用液氮冻干，用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取样品的 RNA，cDNA 合成根据反转录试剂盒操作进行，-20℃冻存。

进一步，步骤三中，所述 ZIP 家族分析，包括：

ZIP 家族 PF02535 在植物铁和锌的转运中起到重要作用；选取在转录组中差异表达的两组 ZIP 基因来区分缺锌，四组 ZIP 基因简单命名为 ZIP1 和 ZIP2。

进一步，步骤四中，所述引物设计，包括：

根据 ZIP 基因的序列，应用 primer5 软件设计每个基因的特异性引物；其中，所述引物 ZIP1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述引物 ZIP2 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述内参引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；所述引物对中的两条单链 DNA 既可分贝单独包装，也可等摩尔混合包装。

进一步，步骤五中，所述引物的特异性验证，包括：

以提取的正常样品的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，扩增的目的条带的大小分别为 267bp 和 291bp；回收 PCR 产物，连接 T 载，进行测序，与 ZIP1 和 ZIP2 的核酸序列进行比较，以检测该引物的特异性；其中，所述 ZIP1 的核酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，所述 ZIP2 的核酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

其中，所述 PCR 反应体系，包括：

总反应体系：25μL；2*Vazyme LAMP Master Mix：12.5μL；ZIP-F：1μL；ZIP-R：1μL；cDNA：1μL；ddH₂O：9.5μL。

所述 PCR 反应程序：94℃预变性 4min；94℃变性 30s，54℃退火 30s，72℃延伸 45s，共 35 个循环；72℃补充延伸 10min；PCR 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测。

进一步，步骤六中，所述实时荧光定量 PCR 检测，包括：

利用 iTaqTM Universal SYBR Green Supermix，即 Bio-RAD 试剂盒以及 ZIP 基因检测引物、内参引物，采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR

检测；荧光定量 PCR 结束后对结果进行熔解曲线分析，再次验证扩增的特异性。

其中，所述荧光定量体系如下：

总反应体系 20 μ L；2*LightCycler SYBR Green I Master：10 μ L；上游引物-F：0.5 μ L；下游引物-R：0.5 μ L；模板：1 μ L；ddH₂O：加水至总体积 20 μ L。

所述实时荧光定量 PCR 的过程中，扩增程序为：95℃预变性 15min；95℃变性 10s；60℃退火 30s；共 40 个循环；PCR 完成后按 0.1℃s⁻¹ 升温速率从 72℃上升至 95℃进行溶解曲线的分析验证；采用实时荧光定量 PCR 仪进行；循环结束后，采用仪器自带的分析软件，分析扩增结果。

本发明的另一目的在于提供一种应用所述通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法的 ZIP 基因的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，所述 ZIP 基因的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，包括一组 AcZIP 表达水平检测引物和一对槟榔内参基因。

本发明的另一目的在于提供一种所述 ZIP 基因的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒在检测槟榔是缺铁还是缺锌中的应用，所述应用方法，包括：

提取待测样品的基因组 RNA，逆转录为 cDNA 为模板，使用试剂盒中的 ZIP 基因检测引物与内参引物进行 RT-qPCR 反应，以正常样品为对照，按照 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算相对丰度，得到基因的相对表达量；

根据 AcZIP 家族的相对表达量，若 ZIP1 在新叶中表达量没有显著变化，在根中表达量显著增加，ZIP2 在新叶中表达量显著上调，在根中没有显著变化，说明植株受到缺锌胁迫。

进一步，所述待测样品包括槟榔叶片和槟榔主根。

结合上述的所有技术方案，本发明所具备的优点及积极效果为：本发明提供的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法，利用缺锌的处理引起基因表达量的差异，根据差异基因在不同处理的表达量的趋势变化不同，得到检测槟榔缺锌的检测引物；试剂盒内的检测引物具有很高的特异性，只需提供正常的样品以及出现黄化的样品，然后通过实时荧光定量 PCR 技术

判断槟榔幼苗是否处于缺锌状态，以便对后续处理提供依据。

本发明还开发出一个基于 ZIP 家族的实时荧光定量的槟榔缺锌的诊断试剂盒，只需提供样品，按照所提供的方法进行检测，即可确定槟榔幼苗缺铁和缺锌状态的原因，为后续预防提供依据。

本发明通过结构域的差异获得 ZIP 家族基因，并通过实时荧光定量 PCR 验证，获得可以判断槟榔缺锌的状态的 AcZIP 基因。本发明通过引物凝胶成像以及熔解曲线说明了引物的特异性，而实时荧光定量 PCR 结果的相互印证说明了结果的可靠性。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对本发明实施例中所需要使用的附图做简单的介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 是本发明实施例提供的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法流程图。

图 2 是本发明实施例提供的利用引物进行 PCR 验证引物特异性的凝胶成像验证图。

图 3(a)和图 3(b)是本发明实施例提供的利用荧光定量 PCR 方法检测槟榔基因相对表达量的结果图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种通过 AcZIP 家族基因差异性

表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法，下面结合附图对本发明作详细的描述。

如图 1 所示，本发明实施例提供的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺锌状态的方法包括以下步骤：

S101，实验基地进行槟榔缺锌的处理；

S102，进行样品的采集；

S103，进行 ZIP 家族分析；

S104，进行引物设计；

S105，进行引物的特异性验证；

S106，进行实时荧光定量PCR检测。

下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步描述。

本发明开发出一个基于ZIP家族的实时荧光定量的槟榔缺锌的诊断试剂盒，只需提供样品，按照所提供的方法进行检测，即可确定槟榔幼苗缺铁和缺锌状态的原因，为后续预防提供依据。

本发明的目的是提供了一种通过 AcZIP 差异性表达来判断槟榔幼苗缺锌的状态的试剂盒及应用，该试剂盒包含了一组 AcZIP 表达水平检测引物，一对槟榔内参基因。该试剂盒通过槟榔对缺锌的响应，引起的槟榔相关基因的差异表达，以此来确定槟榔是否缺锌，具有特异性强、易于操作、结果可靠的特征，具有极大的潜在应用价值。

本发明提供了一种快速检测槟榔缺锌的实时荧光定量试剂盒，所述试剂盒包括一组基于 ZIP 家族的检测引物、以及内参引物。

本发明的完整步骤：

1、实验基地进行槟榔缺锌的处理

在实验基地以 Hoagland 为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁和缺锌的处理，每隔一周时间进行培养液的更换，直到槟榔幼苗出现明显的表型。缺锌的槟榔幼苗的新叶呈网格状的黄化现象。

2、样品的采集

对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用 75%的乙醇擦拭干净，用液氮冻干，用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取样品的 RNA，cDNA 合成根据 TaKaRa 公司反转录试剂盒操作进行，-20℃冻存。

3、ZIP 家族分析

ZIP 家族（PF02535）在植物铁和锌的转运中起到重要作用。选取在转录组中差异表达的两组 ZIP 基因来区分缺锌（结果如图 2-3 所示），四组 ZIP 基因简单命名为 ZIP1 和 ZIP2。

4、引物设计

根据 ZIP 基因的序列，应用 primer5 软件设计每个基因的特异性引物。

ZIP1-F: ATAGCCATTGCTTCGATTCTGACG

ZIP1-R: CGGCGAACGGGAAGTTATGC

ZIP2-F: CTGTCCTTCCACCAGTTC

ZIP2-R: CAAAGAAGCACGCCATCA

内参引物：Actin-F: GTATCGTGCTTGATTATGG;

Actin-R: GCTACTCTTGGCTGTCTCC

其中，所述引物对中的两条单链 DNA 既可分贝单独包装，也可等摩尔混合包装。

5、引物的特异性验证

以提取的正常样品的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，扩增的目的条带的大小分别为 267bp 和 291bp。回收 PCR 产物，连接 T 载，寄送至生工生物工程（上海）股份有限公司，进行测序，与下列的核酸序列进行比较，以检测该引物的特异性。

ZIP1 的序列：

ATGAAGCCTCTTTTTCTCCTCTCCTCCATCTTCCTCCTCCTCCTCCTCC
TCCCTCTCCATGTTCTAGCAGACTGCGAGTGCACCAGCAACCCCGAAGGC
CTCGACACACCGAAGGCTCTAAAGCTGAAGTTTATAGCCATTGCTTCGAT

TCTGACGGCGGGTGCATTGGAGTCCTCCTTCCGATCCTCGGGAGGTCGG
TCGCAGCCCTCCGGCCGGAGAACGATGTGTTCTTCGTAATCAAGACCTTT
GCGGCCGGTGTCACTTGCGACCGGCCTGATTCACATCCTCCCGGCCGC
CTTCGAGAGCTTGACATCTCCTTGTCTAAAGGATGATCCATGGCATAACTT
CCCGTTCGCCGGCTTTGTGGCCATGCTGTCGGCCATCGGGACGATGATGG
TGGACTCGTTTGCCACCAGCTACTATAGAAGGTCTCACTTCAGCAAGGCG
CGGCCTGTGGAAGGAGACGAGGGGGGTATCGGGGATGAGGAGAACTCGG
TAGGCCATGCTGACCACGTGCATGTCCACACGCACGCCACCCATGGCCAC
GCGCATGGCTCGGTGCCGGTCTCGCCGGAGGACGCCTCCCTTGCTGAAAG
AATCCGGCATCGGATTATTTCCCAAGTTTTGGAGTTGGGCATTGTAGTAC
ATTCTCTGGTTATTGGTATTTCTCTGGGTGCTTCTGAAAGGCCCTCCACCA
TAAGGCCTTTGCTGGGAGCCCTGAGTTTCCATCAATTCTTTGAAGGTATAG
GACTTGGTGGATGCATAGTGCAGGCAAACCTTTAGAGCTAAGGCTACGGTG
ATCATGGCAGTCTTTTTCTCTCTCACAGCTCCAATTGGCATTGCATTAGGG
ATTGCAATATCATCAAGCTATGACGAAAATAGCGCAATTGCCCTTATCAT
TGAGGGTATTTTCAATGCTGCCTCTGCTGGAATTCTAATTTATATGGCTCT
CGTTGATCTCTTGGCAGCTGATTTAGCCAACCCTAAGATACAAAATAATG
GGAGGCTTCAACTAAGAACACATCTTGCCCTTCTTCTTGGTGCAGCTTTAA
TGTCATTCTTGCCAAATGGGCTTAG

ZIP2 的序列:

ATGGTGGCGGGCGATGGAGAATGCCGTGACGACGAGGCTGCGATAC
CCTTGAAACTGGCCGCAATCGCCGCGATCCTCGTCGCCAGCATAGCCGGT
GTGGCGATCCCGCTCGCCGGGAGACGGCGGCCGTTCTCCTCCCCGACGG
TGGCGGGTTCCTCTTCGTCAAGGCCTTTGGAGCGGGCTTGATCCTGGCGA
CGGGATTTCGTCCACATGCTCCCCGAGGCGGCGGAGTCGCTGGCGGACGCC
GCCATGTCGGCGCGGGCGTGGCCTGAGTTCCCATTCGCGGGCTTTGCGGC
GATATATGGTGGCCGCCCTCGCTACGTTTCGTGCTGGACTTCGTGGAACG
ACGTTCTACGAGCGGGAGCACGGAACGGAGGAGGGAAGCAGGAGGCGA
GGGTTTGGGTCCGGTCCCCGGGGAGTGGCGAGTCAGGCTTGTCCTTGGGG

ATATCACAAAACCGATGCACGATTAGGCCCTGAAATCTGCCCTGTCCTT
CCACCAGTTCTTCGAGGGTTTTGCGCTGGGGGGGATACATCTCTCAGGCTC
AATTCAGCAGTCTCAAAGAAACGGTGATGGCGTGCTTCTTTGGCCTTGAC
AACACCTGGAGGGATCGGCCTGGGGCTCTCAGTGGCATCATTTTATGA

普通的 PCR 反应体系（总反应体系 25 μ L）其中具体体系如下：

2*Vazyme LAMP Master Mix: 12.5 μ L

ZIP-F: 1 μ L

ZIP-R: 1 μ L

cDNA: 1 μ L

ddH₂O: 9.5 μ L

普通 PCR 反应程序：94℃预变性 4min；94℃变性 30s，54℃退火 30s，72℃延伸 45s，共 35 个循环；72℃补充延伸 10min。PCR 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测。

6、实时荧光定量 PCR

利用 iTaqTM Universal SYBR Green Supermix（Bio-RAD）试剂盒及本发明 ZIP 基因检测引物、内参引物，采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR 检测。荧光定量 PCR 结束后对结果进行熔解曲线分析，再一次验证扩增的特异性。

荧光定量体系如下（总反应体系 20 μ L）：

LightCycler SYBR Green I Master（2*）：10 μ L

上游引物-F：0.5 μ L

下游引物-R：0.5 μ L

模板：1 μ L

ddH₂O：加水至总体积 20 μ L

所述实时荧光定量 PCR 的过程中，扩增程序为：95℃预变性 15min；95℃变性 10s；60℃退火 30s；共 40 个循环。PCR 完成后按 0.1℃s⁻¹ 升温速率从 72℃

上升至 95℃进行溶解曲线的分析验证。采用实时荧光定量 PCR 仪进行。循环结束后，采用仪器自带的分析软件，分析扩增结果。

每个 qPCR 反应重复三次。记录 qPCR 反应体系的 Ct 值。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算基因在不同处理下的相对表达量，可以看出 ZIP1 在叶片中几乎不表达，在缺锌的根中表达量显著增加，ZIP1 在新叶中表达量没有显著变化，在根中表达量显著增加，ZIP2 在新叶中表达量显著上调，在根中没有显著变化。

ID	CKL1	-ZnL1	CKR	-ZnR
ZIP1	0.029284	0.227854	1.101192	5.283476
ZIP2	1.836662	3.277534	1.174484	5.868007

本发明所用 RNA 提取方法、反转录方法以及所用试剂皆可在确认原理的情况下进行替换。

本发明通过结构域的差异获得 ZIP 家族基因，并通过实时荧光定量 PCR 验证，获得可以判断槟榔缺锌的状态的 AcZIP 基因。引物凝胶成像以及熔解曲线说明了引物的特异性，而实时荧光定量 PCR 结果的相互印证说明了结果的可靠性。

本发明试剂盒以天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取样品的 RNA，cDNA 合成根据 TaKaRa 公司反转录试剂盒操作进行，利用 iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-RAD) 试剂盒及本发明 ZIP 基因检测引物、内参引物，采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR 检测。

本发明还提供所述 ZIP 基因的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒在检测槟榔是缺铁还是缺锌中的应用，所述应用的方法为提取待测样品的基因组 RNA，逆转录为 cDNA 为模板，使用试剂盒中的 ZIP 基因检测引物与内参引物进行 RT-qPCR 反应，以正常样品为对照，按照 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算相对丰度，得到基因的相对表达量。根据 AcZIP 家族的相对表达量，若 ZIP1 在新叶中表达量没有显著变化，在根中表达量显著增加，ZIP2 在新叶中表达量显著上调，在根中没有显著变化，说明植株受到缺锌胁迫。

本发明中，提取待测样品的 RNA 以及反转的方法不受限制，可以采用任何已知的提取方法或者试剂盒进行。

本发明所述的样品包括槟榔叶片和槟榔主根。

本实验利用缺锌的处理引起基因表达量的差异，根据差异基因在不同处理的表达量的趋势变化不同，得到检测槟榔缺锌的检测引物；试剂盒内的检测引物具有很高的特异性，只需提供正常的样品以及出现黄化的样品，然后通过实时荧光定量 PCR 技术判断槟榔幼苗是否处于缺锌状态，以便对后续处理提供依据。

在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上；术语“上”、“下”、“左”、“右”、“内”、“外”、“前端”、“后端”、“头部”、“尾部”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本发明和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本发明的限制。此外，术语“第一”、“第二”、“第三”等仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。

以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

<110> 海南大学

<120> 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、判断槟榔幼苗缺锌状态的方法

<160> 5

<210> 1

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

atagccattgcttcgattctgacg

cggcgaacgggaagttatgc

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ctgtccttccaccagttc

caaagaagcacgccatca

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gtatcgtgcttgattatgg

gctactcttggtgtctcc

<210> 4

<211> 1080

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

基因序列表

atgaagcctcttttctcctctcctccatcttctcctcctcctcctcctcctcctcctccatgttctagcagactgcgagtgca
ccagcaaccccggaaggcctcgacacaccgaaggctctaaagctgaagtttatagccattgcttcgattctgacggcgggt
gcgattggagtcctcctccgatcctcgggaggtcggtcgcagccctccggccggagaacgatgtgttcttcgtaatcaag
acctttgcggccggtgtcatacttgcgaccggcctgattcacatcctcccggccgccttcgagagcttgacatctccttgtct
aaaggatgatccatggcataacttcccgttcgcggctttgtggccatgctgtcggccatcgggacgatgatggtggactc
gtttgccaccagctactatagaaggctcacttcagcaaggcgcggcctgtggaaggagacgaggggggtatcggggat
gaggagaactcggtaggccatgctgaccacgtgcatgtccacacgcacgccacccatggccacgcgcgatggctcgggtg
ccggtctcgcgggaggacgcctcccttgctgaaagaatccggcatcggattatttcccaagttttggagttgggcattgtagt
acattctctggttattggtatttctctgggtgcttctgaaaggccctccaccataaggcctttgctgggagccctgagttccat
caattctttgaaggtataggacttggtggatgcatagtgcaggcaaactttagagctaaggctacgggtgatcatggcagtcct
tttctctcacagctccaattggcattgcattagggattgcaatatcatcaagctatgacgaaaatagcgcaattgcccttacc
attgagggtattttcaatgctgcctctgctggaattctaatttatatggctctcgttgatctcttggcagctgatttagccaaccct
aagatacaaaataatgggagggttcaactaagaacacatcttgcccttcttcttggtgcagcttaatgtccattcttgccaaat
gggcttag

<210> 5

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

atgggtggcgggcgatggagaatgccgtgacgacgaggctgcgatacccttgaaactggccgcaatgccgcgat
cctcgtcgccagcatagccgggtgtggcgatcccgtcgcgggagacggcggccgttctcctccccgacgggtggcgg
gttctcttcgtcaaggcctttggagcgggcttgatcctggcgacgggattcgtccacatgctccccgaggcggcggagtc
gctggcggacgccgccatgtcggcgcgggcgtggcctgagttccattcgcgggctttgcggcgatatatggtggccgc
cctcgttacgttcgtgctggacttcgtcggaaacgacgttctacgagcgggagcacggaacggaggagggaagcaggag
gcgagggtttgggtccggtccccggggagtggcgagtcaggcttgccttggggatatcacaaaaccgatgcacgattag
gcccctgaaatctgcctgtccttccaccagttcttcgagggttttgcgtggggggatacatctctcaggctcaattcagca
gtctcaaagaaacgggtgatggcgtgcttctttggccttgacaacacctggagggatcggcctggggctctcagtggcatca
ttttatga