

检测黄颡鱼小RNA病毒-1的特异性引物、探针及快速检测试剂盒

|  |  |
| --- | --- |
| 申请号： | CN202110613261.0 |
| 申请日： | 20210602 |
| 申请（专利权）人： | [浙江省淡水水产研究所] |
| 地址： | 浙江省湖州市杭长桥南路999号 |
| 发明人： | [潘晓艺, 蔺凌云, 沈锦玉, 姚嘉赟, 尹文林, 黄雷, 袁雪梅] |
| 主分类号： | C12Q1/70 |
| 公开（公告）号： | CN113278737A |
| 公开（公告）日： | 20210820 |
| 代理机构： | 成都天汇致远知识产权代理事务所（普通合伙） |
| 代理人： | [韩晓银] |

www.patexplorer.com

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **（19）中华人民共和国国家知识产权局** | | |
|  |  |  |
| **（12）发明专利申请** | |
| **（10）申请公布号** CN113278737A  **（45）申请公布日** 20210820 | | |

|  |  |
| --- | --- |
| **（21）申请号** CN202110613261.0  **（22）申请日** 20210602  **（71）申请人** [浙江省淡水水产研究所]  **地址** 浙江省湖州市杭长桥南路999号  **（72）发明人** [潘晓艺, 蔺凌云, 沈锦玉, 姚嘉赟, 尹文林, 黄雷, 袁雪梅]  **（74）专利代理机构** 成都天汇致远知识产权代理事务所（普通合伙）  **代理人** [韩晓银] |  |
| **（54）发明名称**  检测黄颡鱼小RNA病毒-1的特异性引物、探针及快速检测试剂盒 |  |
| **（57）摘要**  本发明公开了一种检测黄颡鱼小RNA病毒?1的特异性引物、探针及快速检测试剂盒，其中，黄颡鱼小RNA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；本发明采用荧光定量技术，通过检测黄颡鱼小RNA病毒?1的衣壳蛋白基因，来检测黄颡鱼小RNA病毒?1，这是目前国内外首次研制检测黄颡鱼小RNA病毒?1的引物组和试剂盒。该试剂盒的研制为黄颡鱼小RNA病毒?1病的监测和预防奠定基础。 |

|  |
| --- |
| **权 利 要 求 书** |

1.检测黄颡鱼小RNA病毒-1的引物探针混合物，其特征在于，其由引物组A和Taqman荧光探针B组成，Taqman荧光探针B的5’端标记有荧光报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团。

2.根据权利要求1所述的引物探针混合物，其特征在于，所述引物组A包含引物YCPRV-1-q85F和引物YCPRV-1-q85R；

所述的引物YCPRV-1-q85F的核苷酸序列如SEQ ID NO：1所示；

所述的引物YCPRV-1-q85R的核苷酸序列如SEQ ID NO：2所示；

所述Taqman荧光探针B的核苷酸序列如SEQ ID NO：3所示。

3.根据权利要求1所述的黄颡鱼小RNA病毒-1Taqman荧光探针B，其特征在于，所述荧光报告基团选自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。

4.一种黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒，其特征在于，包括特异性引物组A和Taqman荧光探针B。

5.根据权利要求4所述的检测黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒，其特征在于，Taqman荧光探针B核苷酸序列5’端标记HEX，3’端标记BHQ1。

6.根据权利要求4所述的检测检测黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒，其特征在于，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4mol/L异硫氰酸胍、0.5％十二烷基肌氨酸钠、40mmol/L DTT、25mmol/L柠檬酸钠、20μg糖原、pH8.0的缓冲液，PCR反应液为探针法荧光定量PCR反应液，阴性质控品为灭菌生理盐水，阳性质控品为含有黄颡鱼小RNA病毒-1衣壳蛋白基因的载体。

7.一种由权利要求4所述的检测黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒在检测黄颡鱼小RNA病毒-1中的应用，其特征在于，包括以下步骤：

待检样品使用病毒核酸提取液提取病毒总RNA，采用一步法RT-qPCR试剂盒进行荧光定量RT-qPCR，反应条件为42℃20分钟，95℃条件下反应10分钟；然后95℃反应10秒，60℃反应32秒，共40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，判为黄颡鱼小RNA病毒-1阴性；如果检测通道出现S型扩增曲线，Ct值≤35，则黄颡鱼小RNA病毒-1别判定为阳性。

|  |
| --- |
| **说 明 书** |

**检测黄颡鱼小RNA病毒-1的特异性引物、探针及快速检测试 剂盒**

**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小RNA病毒-1的特异性引物、探针及快速检测试剂盒。

**背景技术**

黄颡鱼小RNA病毒-1(Yellow catfish Picornavirus，YCPRV-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。YCPRV-1为单链RNA病毒，属于小RNA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小RNA病毒(Conger japonicus Calicivirus)，同源性为38％，表明黄颡鱼小RNA病毒-1是一种全新的病毒，与已知小RNA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7449bp。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，由于黄颡鱼病害的频发，已给广大养殖户造成了巨大的经济损失。黄颡鱼小RNA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。

**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小RNA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小RNA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，可用于黄颡鱼小RNA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，通过检测黄颡鱼小RNA病毒-1的衣壳蛋白基因，来检测黄颡鱼小RNA病毒-1，这是目前国内外首次研制的检测黄颡鱼小RNA病毒-1的试剂盒；该试剂盒的研制为黄颡鱼小RNA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小RNA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。

进一步地，引物组A包含引物YCPRV-1-q85F和引物YCPRV-1-q85R；

引物YCPRV-1-q85F的核苷酸序列如SEQ ID NO：1所示；

引物YCPRV-1-q85R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。

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。

本发明还公开了一种黄颡鱼小RNA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。

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为含有4mol/L异硫氰酸胍、0.5％十二烷基肌氨酸钠、40mmol/L DTT、25mmol/L柠檬酸钠、20μg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小RNA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小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒在检测黄颡鱼小RNA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20-40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，判为黄颡鱼小RNA病毒-1阴性；如果检测通道出现S型扩增曲线，Ct值≤35，则黄颡鱼小RNA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小RNA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小RNA病毒-1，检测灵敏度高，扩增模板仅需15.6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，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小RNA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小RNA病毒-1的第一个试剂盒，填补了黄颡鱼小RNA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：

图1是本发明黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒特异性测试图；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：黄颡鱼小RNA病毒-1；NTC：正常黄颡鱼RNA阴性对照；

图2是本发明黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒灵敏度检测图；其中1-7分别代表1.56×10 6 copies、1.56×10 5 copies、1.56×10 4 copies、1.56×10 3 copies、1.56×10 2 copies、1.56×10 1 copies、1.56×10 0 copies。

**具体实施方式**

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

检测黄颡鱼小RNA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YCPRV-1-q85F和引物YCPRV-1-q85R；

所述的引物YCPRV-1-q85F序列如SEQ ID NO：1所示；

所述的引物YCPRV-1-q85R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。

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

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

黄颡鱼小RNA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。

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0.15μM，探针终浓度为0.1μM。

Taqman荧光探针B，其核苷酸序列5’端标记HEX，3’端标记BHQ1；

阴性质控品为灭菌生理盐水；阳性质控品是以提纯的黄颡鱼小RNA病毒-1基因组为模板，由引物组A进行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；

所述的病毒核酸提取液为含有4mol/L异硫氰酸胍、0.5％十二烷基肌氨酸钠、40mmol/L DTT、25mmol/L柠檬酸钠、20μg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+ 。

实施例3

黄颡鱼小RNA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1mL病毒核酸提取液进行充分研磨，12000r/min离心10min，取上清800uL，加入400uL乙醇，室温5min后，12000r/min离心5min，沉淀用75％乙醇洗一次后，室温干燥5min后，加入50uL 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10uL，加DEPC水3uL，混匀后进行荧光定量RT-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20-40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℃；

结果判断：

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

本发明所述的引物组A和探针B是针对黄颡鱼小RNA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黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒的应用例

(1)病毒总RNA抽提：

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

(2)RT-qPCR：

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

荧光定量RT-PCR反应条件：42℃，20分钟；95℃，10分钟；95℃，10秒，60℃，32秒，40个循环。

采用LightCycler 96System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℃。

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

(3)结果判断：检测通道没有出现S型扩增曲线，判定为黄颡鱼小RNA病毒-1阴性；如果检测通道出现S型扩增曲线，Ct值≤35，则黄颡鱼小RNA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小RNA病毒-1衣壳蛋白基因序列一致。

采用上述黄颡鱼小RNA病毒-1荧光定量检测试剂盒和方法进行快速检测黄颡鱼小RNA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黄颡鱼小RNA病毒-1特异性检测图，如图所示，经Real-time RT-PCR定量检测后，仅黄颡鱼小RNA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。

图2黄颡鱼小RNA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小RNA病毒-1RNA系列稀释的扩增图，当反应体系中加入15.6个病毒拷贝的RNA，扩增显色结果就为阳性。

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

<110> 浙江省淡水水产研究所

<120> 检测黄颡鱼小RNA病毒-1的特异性引物、探针及快速检测试剂盒

<130> 2021

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 1

aaacgcggga atgccttca 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 2

aaagtaggcg tacgcgttca 20

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 3

acgtgcatga atacatggta caactgc 27

<210> 4

<211> 7449

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 4

acgctcttcc gatctgtggt atatttcata ttagatcatt gttttttttt gcattgcggt 60

gcaatttaac tgttcttatt gctattagtt cattgttttt ttgcattgcg gtgcatttca 120

cctgttctta ttgcatttcc acaattattt tataatctta caacgactgc gtattaattt 180

ccttgatacg atgtcccaat ccaagaacac cgtgggatcc acgagaagtg cgcgccatta 240

tagatgctgt aatgtgcggg accactttca ctgccccaca aaggaaacat tggagctgag 300

aggcttcaaa tcatttatgt catccgctgc caccagaata gccaacgcct ttaactgctc 360

cacagcccgt gagggttttg caacactcac tggacttgag gaggacttga ggacgatgga 420

catgatgacc agtatccggg agctcttcac acagtggcaa cacaggccac tgttgaagtt 480

tctggaagac accctagcca aagcagcagc agcaacgctt gtggctaaat caagggatac 540

catctccttg atttgttcta tttttttgtt ggccagggag atgggagcac ttgattttct 600

atccctcctc accggagcta actgctgtcc cagtctctct tctatatgcg ccaaggcgcg 660

ggacctgacc ctatttggtg agtccgatga ggagtcttat gatctcttgt cgttggctgt 720

gtcccttgtc gcgaccctat tgttcaccct tttccttgga aagggttgtg gacggttggc 780

ggcgacagtt gtcacggcac tcaacctgac tggaacacgt gtccacattg agaaaacaac 840

aaaggcatta gttggtgccg ttaaagacaa gatcatggag atgtggcact gggtcacaaa 900

cacgacaccc agtccggatg ctgatgagct tgctaaacaa ctttatgggg tgggaactgc 960

aaccttcctt ttgaatgtgc gtgaactcct gcaggataga cctatcctca cccctgagaa 1020

catcaccaaa gtatccaaca tgcatctcga ggcaaaggat cgccatttat ggtgcacaca 1080

gaatgatggg gcctattgga ccaagcccct acaagaagct atcttagatc tgaaaacttt 1140

tcttgattgc gcaaaatcct ctgtaaggca aacgcctaaa gttctcctcc ttgttggtgg 1200

accgggtacg ggaaagacag tttcatctga atccttcatc aacaagttgg ctgctgagct 1260

taatctttcg aatgtgcaca atgctggaga ctttgtctac taccgcaacc caagtgaaaa 1320

gttctggtcg ggttacactg ggcagagggt tgtcgtgtac gatgatgcgt ggaacacgtg 1380

ttcggatgaa ttaaatgctg agctgctcaa cgttgtcaac accgctggca tggtcaccca 1440

ccaggctggc gttgacaaca aaggtaatat aatcctacaa gctacacatg ttgtcatcac 1500

atccaatcac ctacccagag gaaccaagag aggtgcaaag ctcgaggctg tgaccagaag 1560

atgccatgaa gcttatgagg tgcgtagagt gggcacatac ccaacttttc atgctctcaa 1620

aaaggaagat ggcctcttcc tacaactttc tgatggaacc ccggtttcag atgacaaacc 1680

aatccaccca actttcatat tctcggggtg ggtgcgtcct ctgctagaga gtgatgaaat 1740

agtcgacatc ttttccactg aggcgagtgg ggattcagat ataattcttg aagctgaggg 1800

cgttgaaggt tcctctgaga cactcgagct caggggtgat gagtcctgtg ggggttgtgc 1860

ggatggcacc cactattctc atgacatcaa cgtcaccatt gacaacaacc aactaagtct 1920

tgccaatttc ctcgagaggc aacttgcata taatcccaca cctcaggctt gccacctggc 1980

tttctctgat gatattttcc ccttattgac tgaaggggca caaatgactt gtatcaacgg 2040

tctgacccag acactcgaac tccgaggtgg aatgggaaag ttatgcaagt cgccctttaa 2100

acctgacttg atattgaaag tgccagacga tgttgacctt ctctatggta aggtctgtgt 2160

ggatgatgag tgctgtcttg agcacctcga ctcaactttt cttgtatctt gcccacaaga 2220

cgacaggatg ttgtgggtca actctttggt taacctatgc gcccctggta acagactggt 2280

tggtccccct ctacggttct catgtaatgg gagccgtatc tcagttaaaa catcttcacg 2340

acatggtggg agctctctcc attgcgaact tgatatcaaa agtgagactg aaagtctcat 2400

cactctgggg gaaccaccct atttcccacg cccaaaagca aacctcacct actgggaaag 2460

agccgttacc tggatgatca ataacaagtg gaacatactc attggagcat ttgccgttgg 2520

tttgggtact ctggctttag ctggcctctt caaacttttc tctttcatct tctccccatt 2580

gaaaaccctt gccttaaggg cttggggaga tgaagccgtc agcgatgacg acgatggtgc 2640

tcaggtgccc gactgggctg acctttcaac gcgtgttagc gacgggtttg aagacaatat 2700

taacgaagag gtctccaaga agaccgggga tcccattggt tgcacctgct tcacttgtta 2760

ccaaatgagg agagccctaa gaaacgcacg tcgttccagg aaaactcgga cccgtaagac 2820

caaggcagct ggatcaaaaa ctctgaagct caagggtatt gccgaaacta atgccgcttc 2880

gatctctgac tcattttggt ttggtagtgt tgtcggtaaa ctggatggga aaggggtaca 2940

ctgctccacc aatgttgtgc aggttgactc caacttttgt tacgcaccgg cacatttgtt 3000

tcgtggttat ggacccttct cggtgaaact cacacgtggg cttcatcggg gcgggaaact 3060

agagagacag gaactgaatt tctccctggt tgaagggaag aatatcattc tggattacaa 3120

aagggatatc gctgtttttt cctccaagga cctgccctca aagaggagca tattaaattt 3180

ctttcgtgat caccatgacc caaaagctaa atacatgttg ctccataaga gctcagcaag 3240

attggaacac gcagctgttc ttgaggcaat atccaacctc cgacgtgagg attgttatgt 3300

ccctagagtg gtggctggtg gcaaggcaga aagctacaaa ttggaaacct tcattggctc 3360

atccgcagcc acagtcgatt tcggtgactg tggctcactt ctactttcag attgcgacaa 3420

catcaccatc catgggcatg ttttgtcggc atttgatgac gttgaggagg tggtgtgcgc 3480

cccagtcact agatcggatt tggaggatat ggtctcacag ttcaccaccc caatattgaa 3540

ccccaaaggc aaatactcca acgtcagtga ggtggattgg atggaaacac acttgcccct 3600

gagtatagct ggtgccctca caccaactag caacaacaag acaagccaca tcacccaatc 3660

caacctgcaa ccaagttccg tgaacggtat gatgcagaaa ggatatggat tccccaagaa 3720

gattccagcg gccatgaatg ttacagcact cataaaagcc attgacaagt ggtccttgcc 3780

aacttccgat gggaacataa tcaatgcgcc ggcttatgag aatgccatgg gcgtggtcca 3840

gaggatggcg acacgcttta aagtcggttc caacacacct gccatttgta agatccagaa 3900

tgctgtgaag ggttttcgtg gctcaggccc tttttgcaag gtcacgtcat gtggatcggg 3960

atggcccaaa aagaaaaccg actacataga ctttgagcag ggtacagttt gccccgaatt 4020

agagcgtgct tgctcacaac tgtgggaaga ttatgagcaa ggggattacc cgagatcagt 4080

tttcaaagct gcactcaagg atgagaagcg tcccgtggac aaggtggccc agaataaaac 4140

ccgtgttgta tttggttcac cacttcataa atctttggtg gaccgaatgc tgttttgttg 4200

gctcattgag ggttcaaaga aagagttcaa gtggtacgcc cctggctgca acccaacaag 4260

caccgattgg agcaaaatcg ccaacaggca catgtccgcc ccacacgcgc gggagggcca 4320

tttttctatt gactactctg gcttcgactc tacccaggcg tcaggtgtcg cttttgatat 4380

cataacagcc atagccaagg ggtccggagc caccaccaag cataccaaaa tgatgcaggc 4440

ttcaatatta gattgttaca agagttgtct ggatgtgtat ggcaacacgt ttgttaaaaa 4500

cgcgggaatg ccttcagggg cggttatgac cacgtgcatg aatacatggt acaactgctt 4560

tctgaacgcg tacgcctact tcaatactgt cccaggagcc acctcagact ctttcctgtc 4620

tgaacacatt ttcacggcct atggagatga tgttgtcatc acatccccaa tcacagtcga 4680

ggggttctgc aactctgtga gagtcttcgg taccactgcc actagtgcca ccaagcaagg 4740

tgaaatcctc aaaaccccct tggaggaggt tgtcttcctc tccagaggat ttagatcatc 4800

tgatgagggg ggcgccaggg gctccatgtt ttggttcgca ccattatcat tggaatctat 4860

tgtgccctgc atgtacttca gtgacgccaa aagcacactt gatgatgaag tcaacacctt 4920

gagaaatgtg ttgaaggaat tggccttgca cggagaagag acctatttcc agttcgcgcg 4980

cttttgtacc tctgcagact tcctgagaaa attgccccac gacttggaag tcgcctacat 5040

ttatgaagag tcgagaggcg catgtggaaa accacataaa cactgatggt tttggtacca 5100

tcactcctgg ccgcagccag gaacccggaa tttaagaata tctataatag actttatctt 5160

caaatcctca gcttcaccgc tcaagtgaaa cttacttttt gcacaattct aattgattca 5220

aagttaaaac taatcaataa acatgtcatc caaaattgag tgccccaccc agccagaggt 5280

tgagtcgtct gagttgacct gttgggattg gtcgcctcta ctccttagga gtttggccga 5340

ttacattgaa gttcaggctc ttaaaaagaa aggcctggtt ttccacatcc tcaacaaatg 5400

cagggccatt ccgggatcta tttcttattc cctggtgaat cggtttaaaa cggtactcat 5460

gtacttcttc cctaaaatga agtgctttag ggggaaaaga actgatctgg tggagcccat 5520

cacagttgtg tcaatgggca cctcctttaa cggttttttg accccccaga atgagtttta 5580

ttgcccggac ttctatggag agtccataac actttctgat ccacctcgtc ccaggctttt 5640

ggagctacgt ggtgatacag gggggtgttc aataacatgc agagcttgcg gggtcaagat 5700

caagaagtct aacctgctca agcatctcca agtgtgcccc aagaggaccc agccacccag 5760

acccccttgt cctccaaaga tgacatacaa aaagacacca gcaggacaac ttaaggtgaa 5820

acaagctggc cccaagcaaa tagcccccat accaatgcgt gatgatccca agggaaaggg 5880

taggtggtgg atttcttcca acctcgctgc ctattcccca gcccatgctg accaacacaa 5940

ggggttggcc tgtggtgacc gtggtaagtc acttaaatgg actgatgtgg tggagaaatc 6000

ctacacattt aatgaggttg gagacctcct ggtcctggga actgggcttg tggagtcacc 6060

gtatgcagtg gtggcaacca aagatgggtc aacgtccact ggatctaccc ttccagacat 6120

tttccacccc gtgatgtgtg tgggagtgaa tgacagagat gaagacgacc tggatgtcac 6180

tggatcgaaa gacgactcca agctggtcat aacaaaaatg tttgacacac ctgaaagtca 6240

tgaaaaacac cgcatggttg gaagctccat cactatcaca gtaagtggag aagctggcag 6300

agtgaacatc gccgaactca cctctggacc tgagaaggac gatttgaaaa ccgtccacat 6360

gaccagatta caccaaactg acggtcatac agcacataat gggaaggagg gcctctacat 6420

catcagtaag ccagcacatg atcatgatcc aaccaactgg atggataatg gtgatgtgat 6480

cccagcactg acatccctgg tttctatgga agatggaggt gccgacaagg agcacaacat 6540

cacctggaag actgcagagg caatgcatct gagcggacgc gggctgcagt tcgcgaagct 6600

tgatggggtg cacgctggtg tgactgttac tgttaaggtt gtgctgcaca tggagtacaa 6660

ggttgaccca acccactccc atgccaggta cctcacccct acaaacgtag tcggaggagt 6720

tcctggggcg gcccatcgca acgtgtacca gcgcatttgg tctggctacc cagcccatta 6780

caacgacctc aagggcttct tagcaggtct tgcaagtgtg ctagcgtcaa tcggagctat 6840

cgttgctgtc ttcatccccc ctgcaggagc cgtaattgga gccgtgggcg caggggttgg 6900

tggcgtcgca gcaatcctct aaattgaacc aaaaaccaac caacatcaac cctctcataa 6960

ttcgaagttt gtaactactc tcttcttact catttgaggt ttgctagcat ttcaaccata 7020

atggaaagag agcacaggta gtgcctcaag tacaaaagcc ccatacaacc agtgtgttgc 7080

gggatcagat acctgaacta aacagaacgg gaacggtaac tgagttgatt gctgcaaatt 7140

ctttcgctga ggtagggaaa cataaaattt cctactttct ttcccatcct tcctcagcgg 7200

atacctttaa tgcgtgtgtc caccccagtg gtgtaccacg catctccttc agtatatctg 7260

tgggacgtct caaaggcgtt tcaacacgga tctcctgtgg ggggaaaccg tgttctcaag 7320

gcttgtcacc aaaggtggcg tgcaatgggt gcacgttact tttccccctc ggggggttca 7380

tggtgaatat gcttatttga gacagaaata cacttctttt ataaacatca aaaaaaaaaa 7440

aaaaaaaaa 7449

|  |
| --- |
| **说 明 书 附 图** |

