

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/47

A61K 38/17

C12N 15/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819924.6

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678632A

[22] 申请日 2003.8.22 [21] 申请号 03819924.6

[30] 优先权

[32] 2002.8.22 [33] US [31] 60/404,922

[86] 国际申请 PCT/CA2003/001323 2003.8.22

[87] 国际公布 WO2004/018706 英 2004.3.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.22

[71] 申请人 加拿大国家研究所

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 苏珊·道格拉斯 杰弗里·加朗特

亚历山大·帕特里凯特

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 3 页 说明书 77 页 附图 36 页

[54] 发明名称 一种从硬骨鱼中鉴定新的广谱抗菌肽的基因组途径

[57] 摘要

本发明提供了一种鉴定编码抗菌肽的候选核酸序列的方法。该方法包括：鉴定感兴趣的起始肽；鉴定编码所述起始肽的基因组 DNA；鉴定位于所述起始肽每一侧的侧翼序列；获得与所述侧翼序列互补的引物；及大范围筛选核酸序列来鉴定能够使用步骤 e) 的引物来扩增的候选序列。在一些例子中，所述抗菌肽为 hepcidin 或 pleurocidin。

ISSN 1008-4274

1. 一种鉴定编码抗菌肽的候选核酸序列的方法，所述方法包括：
- a) 鉴定感兴趣的起始肽；
 - 5 b) 鉴定编码所述起始肽的基因组 DNA；
 - c) 鉴定位于所述起始肽每一侧的侧翼序列；
 - d) 获得与所述侧翼序列互补的引物；及
 - e) 大范围筛选核酸序列来鉴定能够使用步骤 d) 的引物来扩增的候选序列。
- 10
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的感兴趣的起始肽具有至少两个单位的正电荷并含有两性结构。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的感兴趣的起始肽为
- 15 hepcidin、pleurocidin、pardaxin、misgurin、HFA-1、piscidin、moronecidin、parasin 或鲶鱼组蛋白 2A 的裂解产物。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的感兴趣的起始肽为 hepcidin 或 pleurocidin。
- 20
5. 如权利要求 1、2 或 3 所述的方法，还包括预测所述候选序列编码的氨基酸序列以及选择核酸序列的步骤 g)，所述的核酸序列被预测为编码含有两性结构和净电荷的肽。
- 25
6. 如权利要求 5 所述的方法，还包括获取对应所述候选核酸序列的肽及检测所述肽序列的抗菌活性的附加步骤。
7. 如权利要求 1 所述的方法，还包括验证所述的感兴趣的起始肽具有抗菌活性的附加步骤(a')。

8. 能使用上述任一权利要求所述的方法鉴定的分离的核酸序列。
9. 能由权利要求 8 所述的核酸序列编码的分离的多肽。
- 5 10. 含有侧翼序列的分离的核酸序列。
11. 一种试剂盒包括：
- a. 与第一侧翼序列具有至少 95%同一性的第一核酸序列，其位于或接近编码抗菌肽的靶序列的 5'末端；
- 10 b. 与第二侧翼序列具有至少 95%同一性的第二核酸序列，其位于或接近编码抗菌肽的靶序列的 3'末端；及
- c. 实施如权利要求 1 所述的方法的说明书。
12. 信号序列 I、酸性序列 I、信号肽 II、信号肽 III、信号肽 IV、信号肽 V、原序列 I、原序列 II、编码上述序列的核酸序列及基本与这些编码核酸序列互补的核酸序列中的至少一种在抗菌肽的鉴定和扩增中的用途。
- 15 13. 与肽 a、b、c 或 d 中的一种至少有 80%同源的分离的抗菌肽：
- 20 肽 a GW(G/K)XXFXK
- 肽 b GXXXXXXXXHXGXXIH
- 肽 c FKCKFCCGCCXXGVCGXCC
- 肽 d CXXCCNCC(K/H)XKGCGFCCKF
- 肽 e FKCKFCCGCRCGXXCGLCCKF
- 25 肽 f XXXCXXCCNXXGCGXCCKX。
14. 如权利要求 13 所述的抗菌肽，其与肽 a、b、c 或 d 中的一种至少有 90%同源。
- 30 15. 如权利要求 13 所述的抗菌肽，其为肽 a、b、c 或 d 中的一种。

16. 如附件 I 或附件 II 中所示的分离的核酸序列。

17. 如表 4 或表 13 中所示的分离的核酸序列。

5

18. 一种鉴定编码抗菌肽的候选核酸序列的方法，所述方法包括：

a) 鉴定编码感兴趣的起始肽的核酸序列；

b) 鉴定编码所述起始肽的基因组 DNA；

c) 鉴定位于所述起始肽每一侧的侧翼序列；

10 d) 获取与所述侧翼序列互补的引物；及

e) 大范围筛选核酸序列来鉴定能够使用步骤 d) 的引物来扩增的候选序列。

一种从硬骨鱼中鉴定新的广谱抗菌肽的基因组途径

5 技术背景

目前已从多种植物、动物中分离了抗菌肽,其在防御微生物入侵中发挥重要作用。根据其二级结构和氨基酸序列的相似性它们主要分为三类: α -螺旋结构、高二硫键结合(富含半胱氨酸) β -片层及含高百分比单氨基酸(诸如脯氨酸或精氨酸)。

10 大多数分子为两性的并含有阳离子和疏水表面,使其能够插入生物膜中。尽管抗菌肽的作用方式之一被描述为溶解病原体,但它们也可以通过与细胞内靶标的结合来发挥作用。有报道表明它们还具有多种作用,例如介导炎症和调节免疫反应。

已经从硬骨鱼(teleost)中分离了少量的天然抗菌肽,包括从美洲拟鲈(winter flounder)皮肤中分离的 pleurocidin (Cole, Weis et al. 1997)、从红海 Moses sole 中分离的 pardaxin (Oren and Shai 1996)、从泥鳅中分离的 misgurnin (Park, Lee et al. 1997)、从八目鳗鱼中分离的 HFA-1(Hwang, Seo et al. 1999)、从杂交条纹石鲈嗜酸性粒细胞中分离的 piscidin (Silphaduang and Noga 2001)、从杂交条纹石鲈分离的 moronecidin (Lauth, Shike et al. 2002)、鲶鱼的组蛋白 2A 降解产物 parasin (Park, Park et al. 1998)以及一些鲤鱼(LeMaitre, Orange et al. 1996)和鲑鱼(Smith, Fernandes et al. 2000)的未进行特征鉴定的黏液性分泌物。此外,还有从鲨鱼(海绿角鲨)中分离的阳离子类固醇抗生素角鲨胺(squalamine) (Moore, Wehrli et al. 1993)。

已经在昆虫的脂肪体和软体动物和甲壳类动物的血淋巴中发现了 defensin 家族的富含半胱氨酸的抗菌肽。它们同样可从各种哺乳动物的上皮细胞以及诸如中性粒细胞和巨嗜细胞的循环细胞中分离。最近,从血液的超滤液(Krause, Neitz et al. 2000)、人的尿道 (Park, Valore et al. 2001)以及细菌刺激(challenged)的杂交条纹石鲈的鳃(Shike et al. 2002)中分离了25 小分子富含半胱氨酸的肽,其表现出抗各种真菌、革兰氏阳性及革兰氏阴性菌的抗菌特性。这些称为 hepcidin 或 LEAP-1 (肝表达抗菌肽)的肽30

已被认为是在脂肪体中由感染诱导的昆虫肽的脊椎动物对应体(Park, Valore et al. 2001)。

抗菌肽具有多种潜在的用途(参见例如 Hancock 的 US 6,288, 212) 。
鉴定抗菌肽的常规方法包括从组织或分泌物中进行生物化学提纯。对组
5 分进行抗菌活性的检测, 并随后对具有活性的纯化的肽进行测序。这种方法费时费钱并且不适合鉴定低含量或难以纯化的抗菌肽。

因此, 本发明的目的是提供一种鉴定潜在的抗菌肽的方法。

发明概述

10 一方面, 本发明提供一种鉴定编码抗菌肽的候选核酸序列的方法, 所述的方法包括:

- a) 鉴定感兴趣的起始肽;
- b) 鉴定编码所述起始肽的基因组 DNA;
- c) 鉴定位于所述起始肽的每一侧的侧翼序列(flanking sequence);
- 15 d) 获得与所述侧翼序列互补的引物; 及
- e) 大范围筛选核酸序列来鉴定能够通过使用步骤 d)的所述引物来扩增的候选序列。

一方面, 本发明提供 hepcidin 样肽的核苷酸及推导的氨基酸序列。

另一方面, 本发明提供 pleurocidin 样肽的核苷酸及推导的氨基酸序
20 列。

另一方面, 本发明提供适合用于鉴定、分离和/或扩增编码新的微生物肽的核酸序列的引物。

另一方面, 本发明提供鉴定编码抗菌肽的核酸序列家族的方法。

25 附图的简要说明

图 1 所示为美洲拟蝶的 pleurocidin WF2 cDNA 的文本与图解描述(A), 预测的肽 WF2 疏水区(plot)的图示(B)及预测的 WF2 的螺旋结构的示意图(C)。

图 2 所示为某些 hepcidin 样 cDNA 扩增结果。

30 图 3 所示为某些对齐的 pleurocidin 样肽序列。

图 4 所示为某些 pleurocidin 样基因组序列的 PCR 扩增结果。

图 5 所示为延伸的 WF4 基因组序列。

图 6 所示为某些对齐比较的 pleurocidin 样多肽序列。

图 7 所示为在不同美洲拟鲈组织中的某些 pleurocidin 样基因表达的
5 结果。

图 8 所示为美洲拟鲈发育中某些 pleurocidin 表达的 RT-PCR 结果。

图 9 所示为美洲拟鲈发育中某些 pleurocidin 样基因表达的研究结果。

图 10 所示为美洲拟鲈的某些 pleurocidin 基因的 Southern 分析结果。

图 11 所示为美洲拟鲈的某些 pleurocidin 基因的基因组构成示意图。

10 图 12 所示为位于美洲拟鲈的 pleurocidin 基因上游的某些转录因子结合位点的示意图。

图 13 所示为显示肽 NRC-15 对细菌活存影响的结果。

图 14 所示为显示肽 NRC-13 对细菌活存影响的结果。

图 15 所示为显示肽 NRC-12 对酵母活存影响的结果。

15 图 16 所示为编码 I 型 hepcidin 的未拼接(A)和部分拼接(B) cDNA 核苷酸序列以及人、小鼠和鲑鱼中的 hepcidin 基因内含子/外显子的结构示意图(C)。

图 17 所示为对齐比较的来自不同物种的某些 hepcidin 序列。

20 图 18 所示为对齐比较的美洲拟鲈(A)和大西洋鲑鱼(B)的 hepcidin 基因的某些 3'非翻译区。

图 19 所示为不同鱼类的某些 hepcidin 的 Southern 杂交分析结果。

图 20 所示为在美洲拟鲈的不同组织中的某些 hepcidin 和肌动蛋白(actin)基因表达的分析结果。

25 图 21 所示为在对照和感染的鲑鱼的不同组织中的某些 I 型(a)和 II 型(b)hepcidin 和肌动蛋白基因表达的分析结果。

图 22 所示为发育中的美洲拟鲈幼鱼中的某些 I 型(A)、II 型(B)、III 型(C) hepcidin 和肌动蛋白(actin)基因表达的分析结果。

图 23 所示为所述鉴定 pleurocidin 的方法的实施方案中采用的步骤的示意图。

30 图 24 所示为所述鉴定 hepcidin 的方法的实施方案中采用的步骤的示

意图。

图 25 所示为在 150 mM NaCe 存在下使用抗菌肽 NRC-13 的试验结果。

5 发明的详细说明

本发明方法建立在如下惊人的发现之上，即抗菌肽(包括但不限于 pleurocidin 和 hepcidin)周围的侧翼序列是保守的。本发明的方法提供了鉴定编码 pleurocidin 和 hepcidin 的核苷酸序列以及鉴定被编码的多肽序列的手段。

10 在一个实施方案中，一般来说，所述的方法提供了一旦鉴定了一个家族成员，就能鉴定该抗菌肽家族多个成员的途径。起始的家族成员可以是感兴趣的起始肽。能够根据已知或是报道的抗菌活性或根据与其它已知抗菌肽的序列相似性来鉴定感兴趣的起始肽。一旦鉴定了起始肽，就可鉴定编码该起始肽的基因组 DNA，且可确定其侧翼序列。

15 本文所用术语“侧翼序列”是指位于或接近(at or near)编码抗菌肽的靶核酸序列的一个或两个末端的核酸序列。

本文所用的核酸序列“位于或接近”靶序列的末端，如果所述序列部分位于所述基因末端的 50 个核酸之内(无论在编码区之内或之外)。

20 当根据与具有已知抗菌活性的另一个肽的相似性，鉴定感兴趣的起始肽时，所述的起始肽优选具有两性结构和净电荷。在一些例子中，所述的电荷优选至少为 2 的净正电荷。在一些例子中，所述的肽与具有已知抗菌活性的肽有至少 75%、85%或 95%的序列同一性。在一些例子中，鉴定得到的序列相似性可与编码所述已知肽的核酸序列与编码所述感兴趣肽的核酸序列间的相似性有关。在这些例子中，可根据预测的电荷和
25 两性结构来考虑所述感兴趣肽的预测肽。

例如，pleurocidin 和 hepcidin 的前原(prepro-)序列倾向于保守。因此，通过使用对这种序列特异的核酸引物，可鉴定潜在的 pleurocidin-和 hepcidin-编码序列。可选择地或另外地，可检查其它种类的抗菌肽的已知基因序列来鉴定表现为编码保守前原序列的区域，并可使用相似的策略
30 来鉴定这一肽家族的其它成员。由这种序列编码的对应的抗菌肽可使用

在多数 pleurocidin 和 hepcidin 中发现的普遍特性来预测,例如,至少为 2 的净正电荷和两性结构。

对于本文所用的抗菌肽的前(pre-)、原(pro-)及前原(prepro)序列,“前”和“原”具有以下的含义:“前”指所述肽的信号肽部分(或其功能部分)。“原”指原片段(propiece)。在 pleurocidin 中,所述的原片段为位于羧基末端的阴离子区域。在 hepcidin 中,所述的原片段指成熟肽的上游区域。在本文公开的非限制性实施例中,根据其前和原区域设计 pleurocidin 引物,以及根据其前区域和 3'非翻译区(UTR)设计 hepcidin 引物。

10 可通过 PCR 来扩增编码潜在 pleurocidin 或 hepcidin 的核酸序列。这可常规地通过使用一对 PCR 引物来实现,其中一个引物识别与编码氨基末端前原序列的多核苷酸序列互补的核酸序列,其中所述前原序列在所述感兴趣的肽类型中保守,另一个引物与编码所述感兴趣的肽类型的核苷酸的 3'保守区互补。应该理解,可以存在其它前原序列,并对其进行特别地考虑。例如,遗传密码的冗余使得多种核酸序列可编码一种特定的氨基酸序列。如对 5'前原序列的论述中所述,可存在其它的 3'保守序列并可对其进行特别地考虑。当设计引物时,参考预对其序列进行序列扩增种类的已知密码子使用信息是有用的。

20 本发明的一个实施方案中,提供了信号序列 I 或编码此序列的核酸序列在鉴定或扩增潜在的 pleurocidin 中的用途。

信号序列 I

$\text{MKFTATFL(X)}_n(\text{L})_o(\text{F})_p\text{I(F)}_q(\text{X})_y\text{VLM(X)}_z(\text{V})_r(\text{E})_s(\text{D})_t(\text{P})_u(\text{L})_v\text{GE(C)}_w(\text{G})_x$

其中:

25	n 为 1-3	u 为 0 或 1
	o 为 0-2	v 为 0 或 1
	p 为 0 或 1	w 为 0 或 1
	r 为 0 或 1	
	s 为 0 或 1	x 为 0 或 1
30	t 为 0 或 1	y 为 0 或 1

z 为 0 或 1

并有如下的限定:

$$x+o+p=3,$$

$$s+t=1,$$

$$u+v=1,$$

$$w+x=1, \text{ 及}$$

$$5 \quad q+=1.$$

本发明的实施方案中, 提供了序列 PL1 或 PL2 中一个或两个或者编码该序列的核酸序列在鉴定或扩增潜在的 pleurocidin 中的用途。

PL1 GCCCACTTTGTATTCGCAAG

10 PL2 CTGAAGGCTCCTTCAAGGCG

本发明的实施方案中, 提供了酸性序列 I 或编码该序列的核酸序列在鉴定或扩增潜在的 pleurocidin 中的用途。

15 酸性序列 I

$(Y)_a(X)_b(X)_c(E)_d(X)_e(Q)_f(E)_g L(N/D)KR(A/S)VD(D/E)$

其中:

a 为 0 或 1

e 为 1-3

20 b 为 0 或 1

f 为 0 或 1

c 为 1 或 2

g 为 0 或 1

d 为 0 或 1

并具有如下限定:

$$25 \quad a+b=1,$$

$$c+d=2, \text{ 及}$$

$$e+f+g=3.$$

本文所述序列中所使用的“X”指任意氨基酸。特别考虑编码信号序列 I 和酸性序列 I 的核酸序列, 同时也考虑与这类核酸序列互补的核酸序

30

列。

本发明的实施方案中，提供了信号肽 II、III、IV、V 或编码所述肽的核酸序列在鉴定或扩增 hepcidin 中的用途。

5 信号肽 II

MKXXXXAXXVXXVL

信号肽 III

MKTFSVAV

10

信号肽 IV

MKTFSVAVTVAVVLXFICIQSSA

信号肽 V

15 MKTFSVAVAV(T/V)(L/V)VLA(F)_n(V/C)(C/M)(I/F)(Q/I)X(X)_mS(S/T)AVPF
XXV,

其中 n 为 0 或 1 以及 m 为 0 或 1。

20 本发明的实施方案中，提供了原序列 I、原序列 II 或编码所述序列的核酸序列在鉴定或扩增 hepcidin 中的用途。

原序列 I

PEVQXLEEAXSXDNAAAEHQE

25 原序列 II

PFX XVX(X)_n(L/T)EEV(E/G)(G/S)XD(T/S)PV(A/G)XHQ,

其中 n 为 0 或 1,

30 本发明的一个实施方案中，提供了 HcPA3b3'和/或 HcSal3'序列或编码所述序列的核苷酸序列或与编码所述序列的核酸序列互补的序列在鉴

定或扩增 hepcidin 中的用途。

HcPa3b3' 3'ACAACCTCGTCCTTAGG5'

HcSal 3' 3'ACGCCCCGTCCAGGAAT5'

5

用途的非限定性示例

抗菌肽可用于对多种个体的感染进行治疗和/或预防，这些个体包括鱼、爬行类、鸟类、哺乳动物、两栖类及昆虫。

10 抗菌肽同样还可用于减少细菌在表面的生长和/或积累。这对食品工业特别有益，其中抗菌肽可用于包被食品加工、制备和/或包装中使用的各种表面。

本文公开的抗菌肽可以各种途径给药。在一些例子中，口服给药是较理想的。通过包被所述的肽来改进一些类型的口服给药，从而使其在特定的消化阶段优先释放。在一些例子中，在给药的肽中包括前和/或原
15 序列是较理想的(例如改进稳定性或调节活性)。所述的前和/或原序列在适当的阶段能够被内源性蛋白酶降解。当所述个体呼吸空气或对有鳃个体通过加入到水中，肽可通过吸入途径给药。在一些情况下注射给药是较理想的。肽可注射到任何数量的位点中。在一些情况下，静脉内注射是较理想的。在一些例子中，直接注射到感染或潜在感染位点或其附近
20 是较理想的。在一些例子中，局部给药是较理想的。当抗菌肽最好位于远处或特定的位点时，或当所述肽最好能持续一段时间时，可采用基因治疗提供一种或多种抗菌肽在相关组织中的表达。

当所述的个体是饲养或驯养生物例如鱼、鸟类或非人哺乳动物时，生产可表达一种或多种抗菌肽的转基因品种是较理想的。生产转基因动
25 物的方法是公知的(参见例如 Mar. Biotechnol. 4: 338,2002)。

本发明涉及了多种抗菌肽，并且这些抗菌肽均属于本发明的保护范围。作为非限定性的例子，特别考虑包括下列氨基酸序列或与其具有至少 80%或 90%同源性的序列的肽，以及编码它们的核酸序列：

i) GW(G/K)XXFXK

30 ii) GXXXXXXXXHXGXXIH

- iii) FKCKFCCGCCXXGVCGXCC
- iv) CXXCCNCC(K/H)XKGC GFCKF
- v) FKCKFCCGCRCGXXCGLCCKF
- vi) XXXCXXCCNXXGCGXCCKX

5

其它的感兴趣的抗菌序列的特定的非限定性的例子可参见表 4 和表 11。

可对本发明的抗菌肽进行修饰。在一些例子中, 这种修饰可改进所述肽的稳定性或活性。可特别考虑的修饰的例子包括:

- 10 -保守氨基酸的替代(酸性替代酸性、碱性替代碱性、中性替代中性、极性替代极性、疏水替代疏水等等)
 - 在一端或两端加入带正电的氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)
 - 用其它不太可能引起结构变化的氨基酸进行氨基酸替代, 包括 D-氨基酸和缩氨酸拟态物(peptidemimetics)
- 15 -一个或多个氨基酸的缺失
 - C-末端或 N-末端的修饰, 包括甲酯和酰胺化
 - 所述肽的环化形式(其可导致稳定性增加但对活性没有负面影响)

实施例-方法

20

鱼的饲养

- 如所述(Douglas, Gawlicka et al. 1999)对美洲拟鲈进行饲养, 该公开在此引用作为参考。在 Halifax, Nova Scotia 的 Dalhousie 大学的 Aquatron 设备(facility)中, 将圣约翰河血统(stock)的大西洋鲑鱼(Salmo salar L.)维持
- 25 在单程、加热、脱氯的 12°C 新鲜水中。在取样前, 所有的鱼用过量的三卡因(tricaine)甲磺酸盐(MS 222, 0.1g L⁻¹, Argent Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA)安乐死(euthanised)。所有的动物处理过程均经 Dalhousie 大学实验室动物委员会、国家研究理事会-Halifax 地区动物关怀理事会批准。

30

细菌的刺激

在 17°C、胰酶大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)中, 将杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*) 株 A449 (Trust et al. 1983)培养到对数生长中期。检测细菌悬液 600nm 处的光吸收并在无菌 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)中将该细菌重悬至约 5×10^7 cfu mL⁻¹。用 50mg L⁻¹ TMS 麻醉 3 条鲑鱼(每条 200g), 用 50μL HBSS 中的 2.5×10^6 cfu 细菌腹腔注射并使其在新鲜的水中恢复。来自相同种群的未注射的鱼维持在分开的池子中作为对照。注射后 3 天, 如上述将对照和注射的鲑鱼实施安乐死并采集组织样本。从臀静脉采集血液并放入肝素化的容器中。

为了肯定所述的鱼为杀鲑气单胞菌阳性, 对感染和对照鱼的肾脏后叶 (posterior kidney)进行擦拭并接种于胰酶大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA), 在室温下培养过夜。从 Dartmouth, Nova Scotia Bedford 海洋学研究所进行的细菌刺激研究中获得大西洋大比目鱼(halibut)的组织样本。

15 采样

采集组织(食管、胃、幽门盲肠、肝、脾脏、肠、肾脏前叶(anterior kidney)、肾脏后叶、鳃、皮肤、卵巢、直肠、心、肌肉及脑)并放入 RNALater (Ambion, Austin, TX, USA)中, 保存在-80°C 直到使用。在 RNALater (Ambion, Austin, TX, USA)中漂洗不同阶段的幼年期美洲拟鲈和青少年期美洲拟鲈的样本, 然后转移至含有 0.5-1.25 ml RNALater 的 1.5 ml Eppendorf 管中, 保存在-80° C 直到使用。

Pleurocidins

以下的常规方法如图 24 所示。

25

pleurocidin cDNA 的分离

使用简并寡核苷酸(PleuroA, PleuroB; 表 1)来筛选构建自美洲拟鲈皮肤的 cDNA 文库(Gong et al 1996)。将该文库以 80,000 噬菌体/板进行接种, 并且由 8 块板中的每一块构成 HyBond 过滤器上的复制本。利用常规的步骤在 50°C 将放射性末端标记的 PleuroA 和 PleuroB 探针的混合物与所述

的滤器杂交,并将所述的过滤器以 1X SSC/0.1% SDS 在 50°C 洗涤 45 min。在两个重复的过滤器中显示匹配杂交信号的斑块被选取,并重新筛查所述文库直到获得 100%纯度的重组斑块。使用 ABI373 延伸自动测序仪和 AmpliTaqFS Dye Terminator Cycle Sequencing Ready 反应试剂盒 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)对两种重组体进行完全测序。利用 Sequencher (Gene Codes, Inc., Ann Arbor, MI, USA)和 DNA Strider 对序列资料进行分析。利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)对氨基末端信号序列进行预测。用 GCG 包(<http://www.gcg.com>)的螺旋轮规则(Helical Wheel routine)来模建所预测的抗菌肽序列的螺旋结构。

10

基因组 PCR

使用对美洲拟鲈 pleurocidin cDNA 特异的两组引物(PL1/PL2 和 PL5'/PL3'; 见表 1; 图 1)来扩增基因组序列。扩增的条件为: 94°C、1 min; 94°C、30s, 52°C、30 s, 72°C、90 s, 共 35 循环; 及 72°C、2 min, 将产物加到 1%琼脂糖凝胶中。从所述的凝胶中切下条带, 根据厂商提供的说明书利用 Gene-Clean (Bio101, La Jolla, CA, USA)对其进行提取并克隆至 Topo TA2.1 载体(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)上。如上所述, 对来自每个转化的多个分离进行测序和分析。通过与所述的 cDNA 序列比较来确定内含子的位置。

20

通过 RT-PCR 鉴定其它的美洲拟鲈 pleurocidin 样序列

基本上根据 Douglas, Gawlicka 等(1999)所述, 从美洲拟鲈皮肤和肠中分离总 RNA。根据厂商提供的说明书, 利用 RETROScript 试剂盒(Ambion, Austin, TX, USA)进行 2 µg 总 RNA 的反转录。使用 PL3'和对应所述前驱多肽氨基末端的引物(PL5'; 表 1)来进行 PCR。所述扩增的条件为: 94°C、1 min; 94°C、30s, 50°C、30 s, 72°C、90 s, 共 32 循环; 及 72°C、2 min, 将产物加到 2% NuSeive 凝胶中。如上所述进行条带的切胶、克隆和测序。

不同组织的其它的 pleurocidin 样序列的鉴定

利用来自成年皮肤、肝、卵巢、肌肉、脾、幽门盲肠、胃和肠的多

聚腺苷酸 RNA (500 ng), 通过 Northern 分析对 pleurocidin 的组织特异性表达进行了研究。来自对应 WF2 的 cDNA 克隆的全部插入被放射性标记并与印记在 60°C 和 UltraHyb 杂交溶液(Ambion, Austin, TX, USA)中孵育过夜。在暴露于 X 光底片之前, 将该印记在 50°C 和 1X SSC/0.1% SDS 中的严格条件下洗涤 1h。使用对 WF1、WF1a、WF2、WF3、WF4、WFYT 和 WFX(表 2)特异的引物, 采用 RT-PCR 来分析各种组织中不同 pleurocidin 样变体的表达。除退火温度为 52°C 外, 所用的条件如前一段落所述。

不同发育阶段的其它的 pleurocidin 样序列的鉴定

10 利用两套幼年期时间系列来评价发育过程中 Pleurocidin 样基因的表达。在第一系列中, 从 20 条全幼鱼(5 和 13 dph)、10 条全变态(metamorphosing)幼鱼(20 dph)及新变态幼鱼(27dph)的联合(pooled)样本, 两条青少年期鱼(41 dph)的内脏组织, 成年鱼上下侧的皮肤以及成年鱼上下肠组织中分离 RNA。根据所述(Douglas, Gawlicka et al. 1999)分离 RNA, 该公开在此引用作为本文的参考, 并且使用引物 PL5'和 PL2 以及上述 RT-PCR 的条件进行分析。为确认看家基因表达的稳定水平及提供 pleurocidin 表达的内对照, 根据前述(Douglas, Bullerwell et al. 1999)来扩增肌动蛋白 mRNA, 该公开在此引用作为本文的参考。在第二幼鱼时间系列中, 从 20 条全幼鱼(孵化, 5 和 9dph)、10 条全幼鱼(15、20、25、30 及 36 dph)的联合(pooled)样本, 两条青少年期鱼(41 dph)的内脏组织中分离 RNA。使用对 WF1、WF1a、WF2、WF3、WF4、WFYT 及 WFX(表 2)特异的引物进行分析来检测不同发育阶段的不同 pleurocidin 样变体的表达。其条件如上段所述。

25 Southern 分析

对美洲拟鲽、三种其它比目鱼(拟庸鲽 *Hippoglossoides platessoides* Fabricius, 大西洋大比目鱼 *Hippoglossus hippoglossus* L.及美洲黄盖鲽 *Pleuronectes ferruginea* Storer)、黑线鳕鱼(*Melanogrammus aeglefinus* L.)、鳕鱼(*Pollachius virens* L.)及胡瓜鱼(*Osmerus mordax* Mitchill)的 BamHI-和 SstI-酶切的基因组 DNA, 使用源自对应 WF1、WF2、WF3 和 WF4 的基

基因组克隆的全插入作为探针, 顺序进行 Southern 分析。如前所述(Douglas, Gallant et al. 1998), 在 65°C 杂交过夜, 该公开在此引用作为本文的参考, 并将印记在 65°C 和 0.5X SSC/0.1% SDS 中洗涤 1h, 随后暴露于 X 光底片。通过在沸腾的 0.5% SDS 中孵育两次对印记进行剥离, 并通过暴露于 X 光底片过夜来检查残余的信号。

其它鱼类其它的 pleurocidin 样序列的鉴定

从美洲黄盖鲽、美首鲽(witch flounder)、大西洋大比目鱼的皮肤和肠中分离总 RNA, 并如上所述进行反转录(RT-PCR 分析)。从美洲黄盖鲽、美首鲽、拟庸鲽(American plaice)、大西洋大比目鱼的雄鱼生殖腺, 及 Petrale 鲽鱼、C-O 鲽、英吉利鲽、箭齿鲽(Starry flounder)、欧洲鲽鱼(plaice)、格陵兰大比目鱼及太平洋大比目鱼组织样本中分离总基因组 DNA。使用对美洲拟鲽 pleurocidin cDNA 特异的两组引物(PL1/PL2 和 PL5'/PL3'; 见表 1; 图 1), 且扩增的条件为: 94°C、1 min; 94°C、30s, 50°C、30 s, 72°C、90 s, 共 32 循环; 及 72°C、2 min。将产物加到 2% NuSeive 凝胶中, 如上所述进行条带的切胶、克隆和测序。

图 1 为美洲拟鲽的 pleurocidin WF2 的文本和图解描述。图 A 为从皮肤库中分离来自美洲拟鲽的 pleurocidin 的 cDNA 核酸序列。用于 PCR 的引物位置用下划线给出, 推导的氨基酸序列在核酸序列下方用大写字母显示。箭头显示为 pleurocidin 肽的成熟的 5'和 3'末端、菱形显示内含子位置。粗体显示单一的 SstI 限制性内切酶位点(GAGCTC)和假定的多聚腺苷酸位点(aataaa)。图 b 为使用 DNA Strider(Marck 1992)的 Kyte-Doolittle 选项构建的预测 pleurocidin 多肽 WF2 的疏水区(plot)。由垂直的箭头显示了所述成熟的 pleurocidin 的边缘。图 c.为通过 GCG 的螺旋轮法则构建的预测 pleurocidin 多肽 WF2 的螺旋结构的示意图。疏水残基和甘氨酸残基为盒状(boxed)而极性残基不是。发现所述成熟多肽的第一氨基酸(G)位于轮的顶端。

美洲拟鲽基因组中 pleurocidin 样序列的鉴定

使用对 pleurocidin (WF2; Douglas et al., 2001)的放射性标记探针来筛

查美洲拟鲈基因组 λ -GEM 文库。收集四个克隆并不断重复直到获得 100%纯度。使用 *Bam*HI、*Sst*I、*Xho*I 及 *Eco* RI 对克隆作图，选择两个限制性图形不同的克隆(λ 1.1 和 λ 5.1)进行测序。使用 ABI373 延伸自动测序仪和 AmpliTaqFS Dye Terminator Cycle Sequencing Ready 反应试剂盒 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)对两个克隆进行完全测序。利用 WWW Signal Scan (<http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/signal/>)结合 TransFac 和 TFD 数据库对转录因子结合位点进行鉴定，并且通过 Baylor 医学院 (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/gene-search.html>)提供的神经网络软件的真核启动子预测来检测启动子。

10

Hepcidins

以下的常规方法如图 24 所示。

Hepcidin cDNA 的分子特性化

15 从美洲拟鲈 EST 数据库(Douglas, Gallant et al. 1999)中鉴定了 8 条，从大西洋鲑鱼数据库(Douglas, Tsoi et al. 2002)中鉴定了 4 条与人 hepcidin 具有高度相似性的 EST 序列。使用这些序列筛查 dbEST，BLASTX 分析显示来自日本牙鲈的两条相关序列(C23298.1 和 C23432.1)，来自彩虹鳟鱼(rainbow trout)的一条序列 (AF281354_1)和 5 条来自青鳉(medaka)的相同序列 (AU178966、AU179222、AU179314、AU179768 及 AU180044)。
20 使用 Sequencher (Gene Codes, Inc., Ann Arbor, MI, USA)和 DNA Strider (Marck 1992)进行序列分析。使用 ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994)计算对齐和相似性矩阵(matrices)，并使用 SeqVu (Garvan 1996)进行图形可视化。使用在线服务器 PSORT (<http://PSORT.nibb.ac.jp>)、Compute PI (<http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/pitool>)、及网络蛋白序列分析 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_consensus.pl)来分别预测 N 末端信号序列、pI 和二级结构。所述的二级结构预测程序使用七种不同的算法(详细资料参见相关网站)并根据这些结果提供一致预测。

30 Southern 杂交

从美洲拟鲈(*Pleurofzectes americanus*)、美洲黄盖鲈(*Pleuronectes ferruginea*)、美首鲈(*Glyptocephalus cynoglossus*)、日本牙鲈(*Paralichtllys olivaceus*)、拟庸鲈(*Hippoglossoides platessoides*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、黑线鳉鱼(*Melanogrammus aeglefinus*)、胡瓜鱼(*Osmerus mordax*)、
5 八目鳗鱼(*Eptatretus burgeri*)、虎鲨(*Scyliorhinus torazame*)及高首鲟(*Acipenser transmontanus*)中根据前述(Douglas, Bullerwell et al. 1999)制备总基因组 DNA, 该公开在此引用作为本文的参考。根据厂商的说明书利用 *Sst*I 消化 DNA (7.5 μ g), 将所得片段加入到 1%琼脂糖凝胶上。使用 DIG 标记试剂盒(Roche Applied Science, Laval, PQ, Canada)来标记对应 I 型美
10 洲拟鲈 hepcidin 的 WMENPT...GCGFCC 氨基酸残基的 104 bp 探针, 并使用 Easy Hyb 试剂盒(Roche Applied Science, Laval, PQ, Canada)将其与膜在 42°C 杂交 2h。该膜在 0.2X SSC, 65°C 洗涤并用 DIG 发光检测试剂盒(Roche Applied Science, Laval, PQ, Canada)检测信号。

15 通过 RT-PCR 鉴定其它的 hepcidin 样序列

根据本研究确定的 cDNA 序列(表 3)来设计引物。为确认看家基因表达的
稳定水平及提供 hepcidin 基因表达分析的内对照, 对肌动蛋白 mRNA 进行了扩增。使用单引物进行对照来排除单一引物的假象及不用反转录来排除从污染的基因组 DNA 中产生的扩增产物。

20 根据厂商提供的说明书, 利用 RNAWiz 试剂盒(Ambion, Austin, TX, USA)从未感染的成年美洲拟鲈及未感染和感染的成年鲑鱼和大比目鱼组织中分离总 RNA。使用 7mm 发电机将组织在 Polytron 标准转子(rotor)定子(stator)研磨器(Kinematica)研磨。此外, 从 20 条全幼鱼(孵化, 5 和 9dph)、
10 条全幼鱼(15、20、25、30 及 36 dph)的联合样本、两条青少年期鱼(41
25 dph)的内脏组织和成年美洲拟鲈肝脏中分离 RNA。为排除污染的 DNA, 根据指导使用 Ambion DNA-free TM 方案。简而言之, 将 4 单位的 DNase I 加入到重悬的 RNA 中, 并在 37°C 孵育 1 小时。孵育后, 加入 DNase 失活剂来去除酶, 并使用 Beckman DU-64 分光光度计来检测 RNA 浓度。

从 1 μ g 总 RNA 中, 利用 RetroScript 试剂盒(Ambion, Austin, TX, USA)
30 合成第一条 cDNA 链, 利用 rTaq 聚合酶(Amersham Pharmacia Biotech AB,

Uppsala, Sweden)或 Advantage2 PCR 试剂盒(Clontech, Palo Alto, CA, USA)对所述反应产物的组分进行 PCR。引物和退火温度在表 3 中列出。扩增条件是: 95°C、1 min; 95°C、15s, 所述的退火温度、30 s, 68°C、30 s, 共 32 循环; 4°C 保存。以 100 bp 梯状物为标准(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 将扩增产物加到 2% NuSeive 琼脂糖凝胶中, 并利用 GelDoc 1000 影像凝胶记录(documentation)系统(BioRad, Mississauga, ONT., Canada)和 Multianalyst 软件来定量每种产物的含量。

其它鱼类其它的 hepcidin 样序列的鉴定

从细菌刺激的大西洋大比目鱼和大西洋鲑鱼肝脏和脾脏中分离总 RNA, 并如上所述进行反转录(RT-PCR 分析)。使用两组引物(参见 legend, 表 2), 扩增的条件为: 94°C、2 min; 94°C、30s, 52°C、30 s, 72°C、30 s, 共 32 循环; 及 72°C、2 min。将产物加到 2% NuSeive 凝胶中, 如上所述进行条带的切胶、克隆和测序。

活性阳离子肽的预测

图 3 中的成熟肽序列(由从鱼组织扩增的基因和 PCR 产物的核酸序列推导的 pleurocidin 样肽序列)构成了序列选择的基础。通常, 根据广泛的序列分析, 可产生具有净正电荷及模型中有较好分离的亲水和疏水残基的那些肽。尽管有一些假基因包含在成员中, 通常还是可使用那些可能被表达的肽基因(具有启动子)。根据以下列出的几种因素来决定准确的起始/终止残基。在多数情况下, 由于其直接跟随保守的信号肽区域并与其他成熟肽对齐较好, 可较好地确定成熟肽的 N-末端。一旦不能对 N 末端进行直接确定, 可在 N 末端处进行 GW 或 GF 的搜寻尝试, 因为其常出现在阳离子肽中。此外, 可产生两种版本的 WFla (NRC-2 和 NRC-3): 一种含有 N 末端 GRRKRK, 而另一种不含有。在某些情况下, 因为其后直接跟随有保守的酸性原片段, 也可较好地确定成熟肽的 C 末端。但在许多肽中 C 末端氨基酸明显不准确。通常确定 C 末端氨基酸须遵循以下两条法则: (1)一旦甘氨酸出现在 C 末端或其附近, 就认为其是羧基末端酰胺化合物的前体; (2)在 C 末端附近有大量的负电荷氨基酸通常认为是原

片段的一部分而不是成熟的活性肽，而且不包括在所述序列中。

本研究使用的所有的抗菌肽是在英属哥伦比亚大学核酸蛋白服务中心(NAPS)通过 N-(9-芴基)甲氧基羰基(Fmoc)化学合成的。肽序列如表 4 所示。在每种情况下通过 HPLC 和质谱分析来确定肽的纯度。对 NRC-7
5 通过 RP-HPLC 作进一步纯化直到获得同质的样品。

菌株和白色念珠菌(*Candida albicans*)

本研究使用的菌株全部列在表 5 中。大多数非鱼类菌株和 *Candida albicans* 在 37°C 生长在 Mueller-Hinton 肉汤(MHB; Difco Laboratories,
10 Detroit)中，而鱼类细菌保存在 16°C 胰酶大豆肉汤(TSB; Difco, 5g/l NaCl)中。所有菌株储存在-70°C 直到融化使用，并每天进行次培养。以下菌株由英属哥伦比亚大学的 R.E.W. Hancock 教授惠赠：铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) K799 (Z61 的母体)、铜绿假单胞菌 Z61 (抗生素超级易感)，伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*) 14028s (MS7953s 的母体)、
15 伤寒沙门菌 MS7953s (defensin 超级易感)、以及表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) (人类临床分离)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA; 由英属哥伦比亚大学 A. Chow 博士分离)。

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)株 CGSC4908 (*his-67, thyA43, pyr-37*)，
20 胸苷、尿苷和 L-组氨酸营养缺陷型(Cohen et al., 1963)由 E. coli 遗传储存中心(耶鲁大学，New Haven, CT)免费提供。除非特别声明，用补充 5 mg/L 胸苷、10 mg/L 尿苷和 20 mg/L L-组氨酸的 MHB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)来生长 E. coli CGSC 4908。

鲑鱼(salmonid)病原体 *Aeromonas salmonicida* 的两种区域隔离种群
25 (field isolate)来自 IMB 菌株贮藏中心。

最小的抑制浓度

利用由 Wu 和 Hancock(1999)改进的 Amsterdam (Amsterdam, 1996)的微滴定肉汤稀释方法，通过测定最小抑制浓度(MIC)来确定所述抗菌肽
30 的活性。在 96 孔聚丙烯(Costar, Coming Incorporated, Coming, New York)

微滴定板中进行肽的系列稀释。如上所述,将细菌或 *C. albicans* 生长过夜达到中期对数生长阶段,并稀释形成 10^6 cfu/ml 的最终接种体浓度。向 96 孔板中每孔加入细菌或酵母的悬浮液,并在适合的温度下孵育过夜。对于 *E. coli* CGSC 4908,使用附加成分的 MHB。将抑制定义为生长少于或等于在对照孔(没有肽加入)中观察到的生长状态的一半。每一 MIC 测定重复三次。

杀灭分析

通过标准方法学,检测暴露于最小抑制浓度(MIC)和 10 倍其 MIC 的所选择肽的细菌和 *C. albicans* 的活存。试验的生物体生长在 MHB 中并暴露在所述的肽中。在特定的时间间隔从培养物中取出相等的份数,接种在含 MHB 培养板,计数所产生的克隆。将百分比活存对时间以对数刻度作图。每个试验重复两次。

合成的抗菌肽的制备

活性阳离子肽序列的预测

图 3(由从鱼类组织中扩增的基因和 PCR 产物的核酸序列推导的 pleurocidin 样肽序列)中的成熟肽序列构成了序列选择的基础。

针对肽作出的序列选择,所述肽具有净正电荷且在模型中含有空间分离较好的亲水和疏水残基,所述模型通过如下特别制备:

a) 为估计正电荷,设 K 和 R 值为+1、H 为+1/2、D 和 E 为-1,并且 C 末端酰胺化合物计数为附加+1。

b) 用 NRC 镜像网址(<http://bioinfo.pbi.nrc.ca:8090/EMBOSS/index.html>)提供的 EMBOSS Pepwheel 和 Pepnet 互联网工具来分析螺旋轮和螺旋网模型中亲水和疏水残基的分离。

此外,尽管假基因也包括在这些成员中,通常产生可能被表达(具有启动子、可被转录等)的那些肽基因。

根据几个因素来决定准确的起始/终止残基:

a) 在多数情况下,由于其直接跟随保守的信号肽区域并与其它成熟肽对齐较好,可较好地确定成熟肽的 N-末端。

b) 一旦不能直接确定 N 末端, 可在 N 末端处进行 GW 或 GF 的搜寻尝试, 因为其常出现在阳离子肽中。

c) 此外, 产生了两种版本的 WF1a (NRC-2 和 NRC-3): 一种含有 N 末端 GRRK RK, 而另一种不含有; 因为有假说认为带高度正电荷的 GRRK RK 可改进活性, 因此进行该步骤。

d) 尽管在某些情况下, 因为其后直接跟随有保守的酸性原片段, 因此也可较好地确定成熟肽的 C 末端, 但在许多肽中 C 末端氨基酸存在明显的不准确性。通常在确定 C 末端氨基酸时须遵循以下两条法则:

(1) 一旦甘氨酸出现在 C 末端或其附近, 就认为其是羧基末端酰胺化合物的前体;

(2) 在 C 末端附近有大量的负电荷氨基酸通常认为其是原片段的一部分而不是成熟的活性肽, 而且不包括在所述序列中。

通过标准方法, 体外筛查根据上述步骤产生的肽的抗菌活性。在体外表现抗菌活性的那些肽可用作体内使用和用于表面治疗等的抗菌肽。

实施例-结果

Pleurocidins

cDNA 序列

从所述的皮肤 cDNA 文库中分离的 2 个克隆其序列相互一致, 并在去除内含子后与基因组 PCR 产物 WF2 一致(如下)。它们含有 356 bp 并编码 68 个氨基酸的开放读码框架(图 1a)。除了 polyA 尾, 存在 26 bp 的 5'-非翻译区和 84 bp 的 3'-非翻译区。在 polyA 尾上游 22 bp 发现规范的 (canonical)多聚腺苷化信号 AATAAA。所述的开放读码框架的前 22 个氨基酸形成高度疏水区(图 1b), 预测为有切除位点的信号肽, 其准确地与所述的成熟 pleurocidin 的氨基末端匹配。所预测的 23-47 个残基氨基酸序列准确地与发表的成熟 pleurocidin 氨基酸序列匹配(箭头, 图 1a)。所述的成熟肽能够呈现两性螺旋, 其在一个表面以带正电荷的氨基酸为主, 而另一面以疏水氨基酸为主(图 1c)。

羧基末端 21 个氨基酸形成负电荷区, 其不出现在成熟的 pleurocidin

中，肯定了 Cole et al. (2000)最近的报道。

基因组 PCR

使用引物 PL5'和 PL3'扩增了四条不同的条带(WF1-4)(图 4)。每种产
5 物的序列分析结果与条带的大小一致并证实每种扩增产物是不同的(表
6)。使用引物 PL1 和 PL2 扩增了两条不同的条带分别对应 WF2 和 WF4，
其含有附加的上游和下游序列(数据未显示)。当去除内含子序列后，WF2
序列可准确地与分离自所述皮肤文库的 pleurocidin cDNA 克隆匹配(图
1a)。

10 图 4 为美洲拟鲈基因组 DNA 的 pleurocidin 样序列 PCR 扩增结果的
描述。将扩增产物(P)加到 1%琼脂糖凝胶并使用 100 bp 梯状带作为分子
量标准(M)。可见的不同条带产物标为 WF1 (00 bp)、WF2 (810 bp)、WF3
(650 bp)和 WF4 (510 bp)。

所有四种 pleurocidin 样基因在编码序列中含有两个内含子，并且三
15 个基因显示一致的内含子位置(WF1、WF2 和 WF4)。然而，WF3 中的第
二内含子位置出现在其它基因的内含子位置上游，产生较短的第二外显
子和较长的第三外显子。四种 pleurocidin 基因中的内含子大小和序列各
不相同(表 6)。使用引物 PL1 和 PL2 从两个更广泛的基因组序列 WF2 和
WF4 获得的证据表明第三内含子紧靠并位于起始密码子上游也是这一基
20 因家族的特征(图 5)。这也证明了 Cole et al (Cole, Darouiche et al. 2000)报
道的基因组序列。

对齐的预测氨基酸序列如图 6 所示。通过与对应的 RT-PCR 和 cDNA
衍生序列比较确定了内含子的位置(垂直箭头所示)。通过与发表的
pleurocidin 氨基酸序列(Cole, Weis et al. 1997)比较，确定了成熟肽的位置。
25 与图 1c 所示相似，所有预测的成熟肽呈现两性 α 螺旋结构，尽管 WF1
和 WF3 中的带正电荷部分不如 WF2 和 WF4 中的那样明显(数据未显示)。

图 5 描述了使用引物 PL1/PL2 通过 PCR 获得的 WF4 扩展基因组序
列。内含子以小写字母显示而编码序列以大写字母显示。下划线部分为
用于 PCR 的引物 PL1 和 PL2 的位置。

30 图 6 描述了对齐的 5 种美洲拟鲈 pleurocidin 家族成员预测的多肽序

列。大的垂直箭头显示为在基因组序列中发现的内含子位置。由小的垂直箭头显示的 WF3 的第二内含子, 比其它基因的那些更位于上游。dermaseptin B1 (Amiche et al. 1994)和 ceratotoxin B (Marchini et al. 1995)的预测多肽序列显示在 pleurocidin 家族成员的下面。框中的氨基酸由一半的序列共享。

从不同组织中来源的其它 pleurocidin 样序列的鉴定

Northern 分析只能测定皮肤中的 pleurocidin 转录本(数据未显示)。但更加敏感的 RT-PCR 分析表明 pleurocidin 还表达在其它组织中, 特别是鳃和内脏中。使用引物 PL5'和 PL3', 可从美洲拟鲈皮肤中获得两条带(265 和 175 bp), 从肠中获得两条(215 和 175 bp)。每种大小的多个克隆的序列分析显示当去除内含子序列后, 265 bp 美洲拟鲈皮肤克隆对应 WF1 基因组序列(表 7)。从皮肤来源的 5 个 175 bp 的克隆和从肠来源的两个 175 bp 克隆对应 WF2 基因组序列。这与使用对应 WF2 探针的 cDNA 克隆的 Northern 分析结果一致, 所述探针只对来自皮肤的 200-核苷酸的 mRNA 显示杂交(数据未显示)。另一方面, 来自肠中的 9 个 175 bp 克隆和来自皮肤的 4 个 175 bp 克隆对应 WF3 的基因组序列。没有获得对应 WF4 的 RT-PCR 产物。所有 7 个 215 bp 肠克隆对应新的家族成员(WF1a), 其不能由任何该研究所确定的美洲拟鲈基因组序列表示。

使用对每种如上述报道的 pleurocidin 样变体以及在 Lambda 克隆中鉴定的其它 pleurocidin 样变体特异的引物, 可证明在不同组织中有不同的变体表达(图 7)。WF2、WF3 和 WFYT 的表达在组织中分布最广, 而 WF1 和 WF4 主要在内脏和皮肤中表达, WFX 只在皮肤中表达。不能在任何组织中检测到 WF1a 的转录本。

图 7 描述了不同美洲拟鲈组织中特异 pleurocidin 样基因的表达。组织为食管(E)、幽门胃(PS)、心脏胃(CS)、幽门盲肠(PC)、肝(L)、脾脏(SP)、肠(I)、直肠(R)、鳃(G)、脑(B)和皮肤(SK)。分子量标准(M)为 100bp 梯状带。引物对每种 pleurocidin 变体均特异(表 2)。

不同发育阶段的其它的 pleurocidin 样序列的鉴定

使用来自 pleurocidin 样肽的高度保守区的引物 PL5'和 PL2(表 1), 显示在 5 dph 时有低水平的转录并在发育中增加(图 8)。从成年皮肤中获得较强的信号而在肠组织中信号较弱。看家基因 actin 的表达在整个发育过程中相对不变。

5 使用对每种如上述报道的 pleurocidin 样变体以及在 Lambda 克隆中鉴定的其它的 pleurocidin 样变体特异的引物, 证明在发育过程中的不同时间有不同变体的表达(图 9)。只在 20 dph 时检测到 WFX 转录本, 在变态前(premetamorphic)幼鱼和变态青少年期鱼中检测到 WF2、WF3 和 WFYT, 在发育的任何阶段均没有检测到 WF1 和 WF4。

10 图 8 所示为 pleurocidin 表达的反转录聚合酶链式反应分析。样本来自幼鱼(5 和 13 dph)、变态(metamorphosing)幼鱼(20 dph)及新变态幼鱼(27 dph)、青少年期鱼(41 dph), 皮肤来自鱼的下侧(LS)和上侧(US), 组织来自鱼的上(UI)下(LI)肠。使用 pleurocidin (组 A)和 actin(组 B)特异引物。

图 9 描述了在美洲拟鲽幼鱼发育中的特异 pleurocidin 样基因的表达。
15 样本来自幼鱼(5、9 和 15 dph)、变态幼鱼(20 dph)及新变态幼鱼(25、30 和 36 dph)、青少年期鱼(41 dph)。也显示了单独使用 5'或 3'引物并且没有模板(NT)的对照。引物为对每种 pleurocidin 变体特异(表 2)。

Southern 分析

20 使用 WF1、WF2、WF3 及 WF4 基因组探针, 对比目鱼(flatfish)DNA 特异的阳性信号如图 10 所示。用黑线鳕鱼、狭鳕鱼(pollock)或胡瓜鱼 DNA 没有检测到信号(数据未显示)。所有四种探针均显示能够与四种比目鱼 DNA 的共用 *Bam*HI 和 *Sst*I 酶切条带杂交, 这表明所述的基因簇集在这些基因组中。美洲拟鲽消化产物的杂交片段大小如表 8 所示。

25 图 10 描述了美洲拟鲽(WF)、美洲黄盖鲽(YF)、拟庸鲽(AP)和大西洋大比目鱼(AH)的 pleurocidin 基因的 Southern 分析结果。通过 *Bam*HI (B)或 *Sst*I (S)来消化总基因组 DNA (7.5 μ g), 将其片段加到 1.0%琼脂糖凝胶上。随后用对应 WF1、WF2、WF3 及 WF4 的探针对印记进行杂交。分子量标准(M)为用 *Sty*I 消化的 lambda DNA(24.0, 7.7, 6.2, 3.4, 2.7, 1.9, 1.4, 0.9
30 Kb)。

其它鱼类其它的 pleurocidin 样序列的鉴定

对齐的从拟庸鲽、美洲黄盖鲽、美首鲽、大西洋大比目鱼推导的 pleurocidin 样肽氨基酸序列如图 3 所示。从 Petrale 鲽、C-O 鲽、英吉利
5 鲽、箭齿鲽、欧洲欧鲽、格陵兰大比目鱼及太平洋大比目鱼的基因组 DNA 中获得序列。高度保守区出现在信号肽和酸性原片段区域中，而对应成熟肽的部分则显示更多的可变性。

图 3 描述了对齐的从以下种类的皮肤和/或肠中扩增的 PCR 产物和基因的核苷酸序列推导的 pleurocidin 样肽序列：美洲拟鲽(WF)、美洲黄盖
10 鲽(YF)、美首鲽(GC)、拟庸鲽(AP)和大西洋大比目鱼(AH)。鉴定的 pleurocidin 样序列的特异非限定性的例子如表 4 所示。cDNA 和/或基因组序列的非限定性的例子见附件 I。

美洲拟鲽基因组中 pleurocidin 样序列的鉴定

15 从美洲拟鲽基因组文库中分离分别含有 12.5 和 15.6 kb 片段的两个克隆。所述的 12.5 kb 片段编码对应 WF2 的基因和两个假基因。所述的 15.6 kb 片段编码对应 WF1 的基因、1 个假基因和两个未曾描述过的 pleurocidin 样序列，将其称为 WFX 和 WFYT。基因排列的示意图如图 11 所示。搜寻编码序列的序列上游发现一个经典的真核细胞启动子，TATA
20 和 CAAT 框以及对多个转录因子高度保守的位点，所述转录因子包括 NF-IL6、AP1 及 α -干扰素(图 12)。在假基因的上游没有鉴定出启动子序列。

图 12 描述了 pleurocidin 基因和假基因上游的转录因子结合位点的位置。启动子用阴影框、内含子用实心框、外显子用点框表示。

25

抗菌活性肽序列的预测和评价

测定了化学制备的肽抗各种细菌病原体和 *C. albicans* 的最小抑制浓度，结果如表 9 所示。一般说来，许多肽都表现出抑制广谱细菌病原体和 *C. albicans* 生长的能力。具有广谱抗菌活性的肽的特别好的例子是来源
30 自拟庸鲽的三种肽(NRC-11、NRC-12 及 NRC-13)以及来源自美首鲽的

三种肽(NRC-15、NRC-16 和 NRC-17)。其中 NRC-15、NRC-13 及 NRC-12 分别具有杀灭耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(图 13)、铜绿假单胞菌(图 14)及 *C. albicans* (图 15)能力。

图 13 描述了暴露于最小抑制浓度(MIC)和 10 倍 MIC 的 NRC-15 后, 革兰氏阳性细菌(耐甲氧西林金黄色葡萄球菌-MRSA)的活存率。金黄色葡萄球菌生长在 Mueller-Hinton 肉汤中并暴露于 MIC 和 10 倍 MIC 的 NRC-15 中。在特定的时间间隔从培养物中取出等份, 并接种在含 MHB 培养板, 计数所产生的克隆。

图 14 描述了暴露于最小抑制浓度(MIC)和 10 倍 MIC 的 NRC-13 后, 革兰氏阴性细菌(铜绿假单胞菌)的活存率。铜绿假单胞菌生长在 Mueller-Hinton 肉汤中并暴露于 MIC 和 10 倍 MIC 的 NRC-13 中。在特定的时间间隔从培养物中取出等份, 并接种在含 MHB 的培养板, 计数所产生的克隆。

图 15 描述了暴露于最小抑制浓度(MIC)和 10 倍 MIC 的 NRC-12 后, 酵母(*Candida albicans*) 的活存率。*C. albicans* 生长在 Mueller-Hinton 肉汤中并暴露于 MIC 和 10 倍 MIC 的 NRC-12 中。在特定的时间间隔从培养物中取出等份, 并接种在含 MHB 培养板, 计数所产生的克隆。

除证明 pleurocidin 样肽具有广泛的抗细菌和 *C. albicans* 活性外, 该结果表明从基因组序列中选择抗菌活性肽时, 哪些因素应优先考虑。

首先, 一组明显的很少或没有观察到活性的肽来自假基因(NRC-8、NRC-9、NRC-10)。这些结果表明, 能够在宿主体中表达的肽可能是较好的抗菌肽候选者。

其次, 前述的 WF1a 中 N 末端 GRRK RK(图 2)被证明是 NRC-3 中抗菌活性的决定因素, 而 NRC-2(与 NRC-3 相同但缺少上述片段)显示只有少量活性(表 9)。这些结果强调了在成熟肽中仔细选择起始/终止残基的重要性, 即使其在最初的前-原-序列中不明显。

因此在本发明的实施方案中, 提供了具有 GRRK RK 氨基酸序列的一组 pleurocidin 相关抗菌肽。应当理解, 也存在缺少这一序列的 pleurocidin 样抗菌肽, 并在本文中特别考虑。

前述的原则在选择抗菌活性肽中是有效的, 所述原则包括: 选择在

螺旋轮模型中具有较好分离的亲水和疏水残基的带正电荷的肽，保存 N 末端的 GW 或 GF，酰胺化具有甘氨酸的 C 末端，及裁剪下酸性 C 末端氨基酸簇。

本发明中的肽可在多种 pH 值、盐浓度及温度下使用。这些肽可用于对抗生长在生物膜中的病原体或其它条件下的病原体生长或培养。参见例如图 25，其中显示了 NRC-13 在 50 mM NaCl 中的杀灭铜绿假单胞菌 K799 的能力。将 NRC-13 加入到附加了 150 mM NaCl 的铜绿假单胞菌培养物中，使其最终浓度为 4 μ g/ml ($\square$)或 40 μ g/ml (Δ)，分别表示 MIC 和 10X MIC。同时显示了没有加入肽的对照($\blacklozenge$)。

可单独使用肽或与其前和原序列的一种或两种同时联合使用。

本发明的肽具有多种用途，包括抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗癌及抗寄生虫剂，并包括与其它抗生素、抗感染剂和化疗剂联合使用以及它们之间的联合使用。

肽可用作免疫调节剂，例如伤口愈合、组织再生、抗败血症、免疫促进剂等等。也包括与其它试剂联合使用。

所述的肽可局部给药(包括例如，特别用于 CF 患者呼吸道感染的气雾剂、软膏、乳液、冲洗剂、眼部洗涤剂等等)，系统给药(包括例如 iv、ip、im、皮下、腔内或透皮给药)及口服给药(例如丸剂、液体药剂、胶囊等等)。

当用于包括农业动物和/或植物的转基因系统给药时，通过包囊(包括在脂质体中)、类蛋白(proteinoid)给药也是可以考虑的。

肽可用作医疗设备(包括货物等等)、食品制备和包装机械中的保护性包被。

能够与本发明公开的肽在养殖作业中一起使用的抗生素的例子包括：Terramycin Aqua (土霉素)、Romet (磺胺间二甲氧嘧啶和 ormetoprim) 及 Tribissen (三甲氧苄氨嘧啶和磺胺嘧啶)。在养鸡场中，甲醛浸泡能够与本发明的肽一起使用。在本文所述的任何用途中，肽可相互组合和/或与常规抗生素联合使用。

30 Hepcidin

鉴定的 hepcidin 序列的特别的非限定性的例子如表 11 所示。cDNA

或基因组序列的例子如附件 II 所示。

细菌刺激

注射后 3 天, 使感染的大西洋鲑鱼昏睡和厌食。在取样中, 注射后
5 的鱼的肾脏后叶为杀鲑气单胞菌阳性, 而对照鱼的肾脏后叶不是。

Hepcidin cDNA 的分子特性

尽管美洲拟鲾 EST 数据库含有来自肝、卵巢、胃、肠、脾及幽门盲
肠的 cDNA 文库的序列, 大西洋鲑鱼 EST 数据库含有来自肝、头肾及脾
10 的序列, 只在两种鱼的脾和肝 cDNA 文库中检测到了 hepcidin 样序列。
美洲拟鲾肝脏文库中 135 个 EST 中的 4 个(3.0%)和美洲拟鲾脾脏文库中
281 个 EST 中的 2 个(0.7%)编码 hepcidin。大西洋鲑鱼肝脏文库中 982 个
EST 中 3 个(0.3%)编码 hepcidin。还发现在扣除的脾脏大西洋鲑鱼 cDNA
库中有 5 个(1.8%)以及扣除的肝脏大西洋鲑鱼 cDNA 文库中有 3 个
15 (0.6%)hepcidin 序列, 所述文库中在杀鲑气单胞菌感染过程中上调的转录
本中增多。但是, 由于它们是扣除文库, 因而插入的仅仅是完全转录本
的部分。

大西洋鲑鱼 hepcidin cDNA 核苷酸序列的分析表明, 一个鲑鱼的
EST(SL1-0412)约为 300 个核苷酸, 长于另外两个。此外该 hepcidin 编码
20 序列是不完全的。此克隆的完全测序表明存在有 2 个具有标准 GT/AG 拼
接连接的内含子(图 16a)。当去除内含子, 可获得编码完全 hepcidin 样肽
的开放读码框架。类似地, 可扩增仍含有第二内含子的不完全拼接大比
目鱼转录本(图 16b)。与哺乳动物比较, 鲑鱼的内含子和可能的大比目鱼
位置相似但长度略短(图 16c)。除这些不完全拼接的 cDNA, 我们还鉴定
25 了美洲拟鲾 EST (WF4), 其相对于其它序列(密切对应鲑鱼和人 hepcidin
的第二外显子)含有较大的缺失。在植物中出现的内含子位置是保守的,
此缺失可与外显子 2 的去除有关, 从而产生与 WF3a 和 WF3b 不同的肽(在
其保留的肽中只有 5 个氨基酸位置不同)。

图 16 描述了编码 I 型鲑鱼 hepcidin 的未拼接的肝脏 cDNA 核酸序列。
30 外显子序列用大写字母表示而推导的氨基酸序列在核酸序列的下方。

gt/ag 内含子/外显子交界用粗体标出, 用下划线给出多聚腺苷酸信号(aataaa)。b为编码I型鲑鱼 hepcidin 的来自大比目鱼脾脏的部分拼接 cDNA 核酸序列。c 为人、小鼠及鲑鱼的内含子/外显子结构比较。用阴影框表示外显子, 用单线表示内含子(大小用 bp 表示在下方)。

5 为了与提取自对应于日本牙鲈(两种)、青鳉(一种)、彩虹鳉鱼(一种) dbEST 的 hepcidin, 以及最近报道的杂交条纹石鲈(Shike et al. 2002)和两种大西洋大比目鱼(Hb 17 and Hb 357)的 hepcidin 的氨基酸序列进行对比, 对齐列出了 5 种不同的美洲拟鲈 hepcidin cDNA 和两种不同的大西洋鲑鱼 hepcidin 推导的氨基酸序列。通过 PCR 从大西洋鲑鱼(Sal2.1 和 Sal8.6)和
10 大西洋比目鱼(HB1.1、HB5.3 和 HB7.5)脾脏和肝获得的序列也包括在内(图 17)。人的 hepcidin 作为哺乳动物的代表也包括在内。通过 PSORT 预测了信号肽酶的裂解位置, 并鉴定了原肽转变酶(Nakayama 1997)典型的 RX(K/R) 基序(motif) (垂直箭头; 图 17)。信号肽序列为 22-24 个氨基酸并且在所有的鱼类序列中高度保守。根据特定的 hepcidin 变体, 阴离子原
15 片段(anionic propiece)为 38-40 氨基酸。加工后的 hepcidin 含有 19-27 个氨基酸, 并除 WF2 外在中性 pH 下均带正电荷(表 10)。在成熟肽中, 来自比目鱼的 I 型和 III 型 hepcidin 和鲑鱼型 hepcidin 含有 8 个半胱氨酸残基, 预计其可形成 4 对二硫键。II 型美洲拟鲈 hepcidin 缺少 2 个半胱氨酸残基, 表明最多可形成 3 对二硫键。Hb357 含有 5 个半胱氨酸残基且与
20 其它的 hepcidin 样序列明显不同。尽管通过某些方法预测了延伸链存在有短的伸展, 二级结构预测方法的结果表明鱼类 hepcidin 的一致结构大部分为随机卷曲。

图 17 描述了美洲拟鲈(WF1、WF2、WF3a、WF3b、WF4)、大西洋比目鱼(Hb1.1、Hb5.3、Hb7.5、Hb17、Hb357)及大西洋鲑鱼(Sal1、Sal2、
25 Sal2.1、Sal8.6) hepcidin 与日本牙鲈(JFL4、JFL6)、青鳉、杂交条纹石鲈和人 hepcidin 的对齐比较。也显示了彩虹鳉鱼的部分序列(GenBank 登录号 AF281354_1)。用箭头表示信号肽酶和前蛋白裂解的预测位置。

从图 17 可见, 非常明显所有比目鱼型 hepcidin 具有非常相似的信号肽, 其某种程度上不同于鲑鱼型和人的 hepcidin。鉴定的其它新的特征包
30 括 hepcidin 不同的分组, 其根据为: (1) 半胱氨酸残基数目, (2) 比目鱼

III 型中独特的插入 FKC, (3) 可能含有独特插入的两个其它位点, (4) 截短的版本(比目鱼 IV 型), (5) 氨基末端较长的版本。

根据对齐比较, 非常明显有至少 3 组不同的比目鱼 hepcidin 其共有的插入和缺失不同。WF2 和 JFL6 (比目鱼 II 型) 在靠近 KR 裂解位点共有一个 7 个氨基酸的缺失, 产生 19 个氨基酸的加工后的肽, 而 WF3a、WF3b、WF4、Hb1.1、Hb17、Hb5.3 及 Sal8.6 (比目鱼 III 型) 仅有 4 个氨基酸缺失(排除对应 WF4 缺失外显子的部分), 产生 22 个氨基酸的加工后肽。WF1 和 JFL4 (比目鱼 I 型) 不含这些缺失, 但相对所有其它报道的 hepcidin 在临近信号肽酶裂解位点处含有插入。此外, 相对所有其它报道的 hepcidin, 石鲈和青鲈的 WF1 在成熟的肽中共有一个氨基酸的插入, 产生 26-27 氨基酸的肽。尽管其在 5' 和 3' 非翻译区含有一些沉默的取代和差异, WF3a 和 WF3b 之间只有一个氨基酸的不同。Hb357 代表可能的第四类比目鱼 hepcidin。WF2 和 WF1 的 3' 非翻译区非常不同于其它的 hepcidin 转录本。与其它比较, WF2 含有较长的附加部分, WF1 较短且保守性略差(图 18A)。

所述的鲑鱼 hepcidin 样肽只有一组; 4 个报道的序列均共有两个缺失, 彼此间在成熟肽中有四个氨基酸不同, 且在上游前蛋白部分有 4 个氨基酸不同。鲑鱼 hepcidin 的 3' 非翻译区仅为中度保守(图 18b)。

图 18 描述了(a)美洲拟鲈(WF1、WF2、WF3a、WF3b、WF4)与(b)大西洋鲑鱼(Sal1、Sal2) hepcidin cDNA 的 3' 非翻译区的对齐比较。框内为保守的核苷酸。用箭头表示用于从大比目鱼和鲑鱼中扩增 hepcidin 同源物的引物位置。

美洲拟鲈 Hpcidin 基因的基因组组成

通过对应 I 型 hepcidin 的探针对多种鱼的基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析, 鉴定了在所有检测的比目鱼中存在而在其它鱼类中没有的条带(图 19)。在美洲拟鲈中, 有两个 4.3 和 4.5 kb 片段与探针杂交。有两个相同大小的美洲黄盖鲈片段(4.3 kb)和两个美首鲈基因组 DNA 片段(4.3 和 20 kb)也被杂交, 而仅有一个拟庸鲈片段(4.3 kb)和一个日本牙鲈基因组 DNA 片段(5.5kb)被杂交。

图 19 描述了不同鱼类中 hepcidin 的 Southern 杂交分析结果。八目鳗

鱼(Hg)、鲨鱼(Sh)、高首鲟(St)、美洲拟鲾(WF)、美洲黄盖鲾(YF)、拟庸鲾(AP)、美首鲾(Wi)、日本牙鲾(JF)、大西洋鲑鱼(AS)、胡瓜鱼(SM)及黑线鳕鱼(Hd)的基因组 DNA 的 *Sst*I 消化产物(7.5 μ g)与美洲拟鲾的 I 型 hepcidin 杂交。分子量标准(M)为 Lambda DNA 的 *Sty*I 消化产物。

5

通过 RT-PCR 对 Hepcidin 样序列的鉴定

图 2 描述了从大比目鱼和鲑鱼肝脏和脾脏 hepcidin cDNA 的扩增。从用细菌病原体感染来诱导抗菌肽基因表达的鱼组织中制备 RNA, 用如下列出的引物反转录和 PCR。Actin 作为对照来显示看家基因的表达。图
10 中的标记为: HL-大比目鱼肝脏; SL-鲑鱼肝脏; HS-大比目鱼脾脏; SS-鲑鱼脾脏; M-分子量标准。引物 5'U 为所有反应使用的通用 5'引物, Sal 为 Hc Sal(如下), WF 为 HcPA3b (如下)。

Hep 通用 5': AAGATGAAGACATTCAGTGTTGCA

HcPA3 3'B2: GTTGTTGGAGCAGGAATCC

15

Hc Sal: TGCTGGCAGGTCCTCAGAATTTC

三种美洲拟鲾 hepcidin 的组织特异表达的 RT-PCR 分析结果如图 20 所示。在肝脏中 I 型 hepcidin 表达丰富, 在心脏胃中相对较少。在任何组织中都检测不到 II 型 hepcidin 的表达, 而在食道、心脏胃和肝脏中 III 型
20 hepcidin 中度表达。

在未感染的大西洋鲑鱼中, 在肝脏、血液和肌肉中 I 型 hepcidin 以相当高的水平表达, 而鳃和皮肤中表达水平较低, 在肾脏前叶和肾脏后叶中几乎不表达(图 21a, 表 10)。II 型仅在鳃和皮肤中以几乎检测不到的水平表达(图 21b)。然而, 用杀鲑气单胞菌感染的鱼在大多数检测的组织中
25 两种 hepcidin 均可表达(参见如下)。

不同年龄的美洲拟鲾幼鱼 hepcidin 基因表达的 RT-PCR 分析结果如图 22 所示。II 型 hepcidin 转录产物在发育的任何阶段均不能检测到, 而 I 型和 III 型 hepcidin 在变态前的幼鱼中能够被检测到。I 型 hepcidin 比 II 型 hepcidin 的表达更丰富并在较早的时间表达(5 dph vs. 9 dph.)。

30

图 20 描述美洲拟鲾不同组织中 hepcidin 和 actin 基因表达的反转录

PCR 分析。使用对比目鱼 I 型(组 A)、II 型(组 B)和 III 型(组 C) hepcidin 和 actin (310 bp)的基因特异引物来进行成年美洲拟鲈扩增产物的扩增,将产物加入 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳。分子量标准(M)为 100 bp 梯状带(BRL)。

5 图 21 描述了对照大西洋鲑鱼(c)和其它用杀鲑气单胞菌(I)感染的鲑鱼的不同组织中的 hepcidin 和 actin 基因表达的反转录 PCR 分析结果。使用对鲑鱼 I 型(组 A)、II 型(组 B) hepcidin (163 bp)和 actin(400 bp)的基因特异引物得到扩增产物,将其加入 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳。分子量标准(M)为 100 bp 梯状带(BRL)。

10 图 22 描述了发育中的美洲拟鲈幼鱼的 hepcidin 和 actin 表达的反转录 PCR 分析结果。样本为 5 dph (泳道 1)、12 dph (泳道 2)、19 dph (泳道 3)、27 dph (泳道 4)及 41 dph (泳道 5)的幼鱼和成年鱼(泳道 6)。使用对比目鱼 I 型(组 A)、II 型(组 B)和 III 型(组 C) hepcidin 和 actin (400 bp)的基因特异引物获得扩增产物,将其加入 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,并使用
15 100 bp 梯状带(Pharmacia) (泳道 M)作为分子量标准。

对其它鱼类的其它 hepcidin 样序列的鉴定

使用根据所有报道的 hepcidin 的信号肽的高度保守序列设计的引物(Hep 通用 5')结合根据鲑鱼(HcSal 3')和比目鱼 (HcPA3b 3')的 3'UTR 的高
20 度保守的序列设计的引物,从大比目鱼和鲑鱼的肝脏和脾脏中扩增 hepcidin 样序列是可能的(图 2)。推导的美洲拟鲈、大西洋大比目鱼和大西洋鲑鱼的 hepcidin 样肽的氨基酸序列的对齐比较如图 17 所示。有意思的是,可以从鲑鱼(S8.6)中扩增比目鱼-型 hepcidin,同时也可从比目鱼(Hb7.5)中扩增鲑鱼-型 hepcidin。从 Petrale 鲈、C-O 鲈、英吉利鲈、箭齿
25 鲈、欧洲欧鲈、格陵兰大比目鱼 and 太平洋大比目鱼的基因组 DNA 中可获得其它序列。

图 17 显示了某些美洲拟鲈(WF1、WF2、WF3a、WF3b、WF4)、大西洋大比目鱼(Hb1.1、HB5.3、Hb7.5、Hb17、Hb357)及大西洋鲑鱼(Sal1、Sal2、Sal2.1、Sal8.6) hepcidin 与日本牙鲈(JFL4、JFL6)、青鳉、杂交条
30 纹石鲈及人的序列的对齐比较。也显示了彩虹鳟鱼的部分序列(Genbank

登陆号 AF281354_1)。信号肽酶和前蛋白裂解物的预测位置如箭头所示。

讨论

Pleurocidin

5 大多数抗菌肽, 包括 cecropin 和 dermaseptin 由多基因家族编码, 其可能由连续的基因复制产生。我们证明美洲拟鲈以及可能的其它比目鱼具有编码与 pleurocidin 相似的抗菌化合物的基因家族。使用 PL1/2 与所述 cDNA 序列获得的基因组扩增产物(图 1a)的比较表明 WF2 与 WF4 含有三个内含子, 其第一个仅位于起始甲硫(蛋)氨酸的上游 1 bp。第二和第三
10 个内含子均位于成熟肽的之中。GLa、xenopsin、levitide 及 caerulein 的基因(所有来自非洲爪蟾的皮肤肽)还含有位于起始甲硫氨酸上游 1 bp 的内含子(Kuchler et al 1989)。除 WF3 外, 在所有基因中内含子的位置是保守的(图 6), 但其大小有显著的差异(表 5), 表明从复制事件的发生开始经历了相当长的进化阶段, 或内含子序列可相对自由的漂移。

15 Southern 分析表明 WF1-4 探针能够与其它比目鱼 DNA 包括美洲黄盖鲈、大西洋大比目鱼和拟庸鲈杂交, 但不与黑线鳕鱼、胡瓜鱼或狭鳕鱼杂交。此杂交可能是由于高度保守的信号序列和我们已经证明在分离自比目鱼的序列中保守的阴离子部分而引起。比目鱼可提供用于养殖业的潜在治疗剂的丰富储备。针对不同 pleurocidin 家族成员的探针常可识别
20 美洲拟鲈 DNA 中相同的限制性区域, 表明它们可能在基因组中集簇在单一的位置上。与 pleurocidin 杂交的两个 Lambda 克隆的全测序证明这种集簇确实存在(图 11)。除其它外, 抗菌肽基因的集簇也在昆虫 cecropins (Gudmundson et al. 1991)和 apidaecins (Casteels-Jossen et al. 1993)中发现。

图 11 描述了美洲拟鲈 pleurocidin 样基因和假基因(Ψ)基因组组成的
25 实施方案的示意图, 内含子由实心框表示, 外显子由点框表示。

Pleurocidin 家族的所有成员编码为前原多肽, 其由跟随有活性肽并由酸性部分结尾的氨基末端信号序列构成。信号和酸性序列的推导氨基酸序列高度保守, 而预测的成熟抗菌肽序列较为可变(图 6)。但是全部都折叠成两性 α 螺旋。这种序列保守性使我们不但可以利用基因组手段从美
30 洲拟鲈中, 而且还可以从多种其它的比目鱼中鉴定 pleurocidin 基因家族

中许多不同的成员(图 3, 表 4, 附件 I)。

Pleurocidin 前原多肽结构与蛙的 dermaseptin 前体具有某种相似性, 其也含有相似长度(22 个氨基酸)的信号序列和 16-25 个氨基酸的酸性部分。从全长 cDNA 克隆来看(图 1a), 该 pleurocidin 的酸性部分显示含有 21 个残基。Pleurocidin 和 dermaseptin 前原多肽的主要区别为 pleurocidin 中酸性部分位于成熟肽的下游, 而 dermaseptin 中位于成熟肽的上游。已认为 Defensin 的酸性原部分通过中和正电荷可防止抗菌肽与膜的相互作用(Valore et al. 1996), 这可能也是其在 pleurocidin 中的功能。这一特性对于释放直到特异切除后才活化的肽特别实用。

pleurocidin 家族成员的信号序列和酸性羧基末端序列极端地高度保守。前者, 也许还有后者推测能够靶定前体分子到细胞膜表明来进行分泌。已经被 dermaseptin 家族 (Valore et al. 1996) 及 Gla, xenopsin, levitide 和 caerulein(所有这些为来自非洲爪蟾的皮肤肽(Kuchler et al. 1989))所描述的具有不同生物活性的末端产物跟随含有高度保守的信号肽抗菌肽基因家族(常由第一外显子编码)。这些作者认为此模块化(modular)基因结构通过通常的途径使得可以实现对显著差异的肽为了分泌而实施靶定。在 pleurocidin 基因家族中, 模块化结构也以编码信号序列和抗菌肽第一半的外显子 2, 编码抗菌肽的后续 10 个氨基酸的外显子 3, 以及编码抗菌肽最后 3 个氨基酸和酸性羧基末端的外显子 4 出现。

由 WF2 和 WF4 编码的成熟肽相互间有 60%相同(图 6), 而与 dermaseptin B1 和 ceratotoxin B 相似较少(Cole et al. 1997)。WF1 与 WF1a 有 64%相同, 但在信号序列与成熟肽间含有明显的 18 个氨基酸的阳离子延伸, 而其在 WF1a 中不存在。当 pleurocidin WF1 加工时是否存在这种潜在的抗菌 18-mer 肽还需鉴定。相对 WF2、WF3 和 WF4 在成熟肽和酸性羧基末端间, WF1 和 WF1a 都含有附加的 10-11 氨基酸。WF3 与 WF2/4 和 WF1/1a 均有相似性。已证明与 WF2 中间部分相同的合成 pleurocidin 能够防止由鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)引起的 Coho 鲑鱼感染, 根据 pleurocidin、dermaseptin 和 ceratotoxin 得到的杂交肽也具有这种作用(Jia et al. 2000)。

通过 Northern 印记分析和 RT-PCR 来评价 pleurocidin 基因的组织特

异表达。对于美洲拟鲽 mRNA 中存在的低水平转录, 已证明 Northern 分析不够敏感。只有在皮肤中有足够的转录量可用此方法来测定, 因此使用更加敏感的 RT-PCR 分析。使用此方法发现在皮肤和肠中均有 Pleurocidin 转录, 这与最近报道的这些组织中 pleurocidin 的超结构定位一致(Cole, Darouiche et al. 2000), 并且支持了 pleurocidin 在粘膜免疫中的作用。转录大小(约 200 bp)与 RT-PCR 得到的产物大小一致(表 7), 表明 pleurocidin 基因是分别转录的。

RT-PCR 分析表明不同 pleurocidin 样肽的基因以组织特异形式表达, 其中 WF2 主要在皮肤和鳃中表达, 而肌肉、肠、胃和肝脏中表达量较少, 而 WF1 和 WF4 主要在鳃和皮肤中检测到(图 7)。WF3 和 WFYT 在多数组织样本中表达, WFX 只在皮肤中检测到, 而 WF1a 在任何组织样本中不表达。可能地, 在两种组织中, 需要不同的抗菌肽控制不同菌群的生长。因为对于 WF4 没有检测到 RT-PCR 产物, 因此可能这种基因只在成年皮肤或肠中以低水平表达或者在不同的生命阶段或在不同的组织中表达。

使用在不同的 pleurocidin 样基因转录产物中没有区别的引物, 表达首先在 5 dph 中检测到并随着其不断成长而呈现不断增加的趋势。但是在使用对 WF1、WF1a、WF2、WF3、WF4、WFX 和 WFYT 特异的引物的近期试验中, 可在不同的发育阶段检测到转录本(图 9)。WFX 仅在 20 dph 时检测到, 而 WFYT、WF3 和 WF2 可在 5 dph 检测到, 并且在 25-36dph 之间具有更高的水平。有趣的是, 在任何幼鱼阶段均不能检测到 WF1, 并且其可能只在特定环境条件下对特定的细菌病原体反应才有表达, 如对 *Drosophila* 所示的(Rivas and Ganz 1999)。这是第一次证明了鱼类中抗菌肽的发育中表达, 并且表明这种天生的免疫成分至少存在于美洲拟鲽的早期幼鱼阶段。变态前幼鱼的死亡受到了极大的关注, 尽管其死亡原因仍不清楚, 有推测可能是由内脏中的高细菌刺激导致的(Padros, Minkoff et al. 1993)。已证明比目鱼的适应性免疫系统发育晚于其它硬骨鱼的免疫系统(Padros, Sala et al. 1991)。因此, 在此阶段幼鱼产生抗菌肽的能力对其活存是至关重要的, 鉴定可增加此种化合物产生的因素对养殖业者有极大的好处。

合成肽抗多种细菌病原体和真菌病原体 *Candida albicans* 的检测结果

表明了具有广谱抗菌活性的有前景的候选者。特别感兴趣的是 NRC-13 和 NRC-15 肽以 4 μ g/ml 的低浓度抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生长的能力。NRC-13 还可在 4 μ g/ml 抑制 *C. albicans* 的生长, 在 1 μ g/ml 抑制铜绿假单胞菌的生长(及在此浓度杀灭铜绿假单胞菌)以及在 2 μ g/ml 浓度抑制杀鲑气单胞菌。这意味着 NRC-13 有高度抗鱼类病原体、革兰氏阴性人细菌、耐药物革兰氏阳性人细菌及酵母的活性。NRC-13 的例子展示了阳性抗菌肽潜在的靶标和应用范围。

这些结果还验证了我们用于从大量序列资料中选择抗菌活性肽的方法。准确预测哪种肽可能具有活性的能力是基因组和治疗学间连接的关键。虽然在这个领域中还有大量工作需要进行, 但我们对前述规则的合理应用的清楚地展示将有助于活性肽的选择。

因此, 已经分离了多种 cDNA 和基因组序列, 其编码与多种比目鱼类中 pleurocidin 相同或类似的抗菌肽前体。Northern 杂交和 RT-PCR 产物的序列分析表明其表达是组织特异的。最重要的是, 测定了发育中的美洲拟鲽幼鱼中不同 pleurocidin 变体的表达时间性, 使得可以对此种鱼的天生免疫系统的发生进行评估。这些 pleurocidin 表达的分析可用于指导在特定组织和/或发育阶段中分离表达的新的肽序列的筛选策略。还可分析影响 pleurocidin 产生的环境因素。

这项工作为进一步研究奠定了基础, 这些研究致力于作为养殖鱼的治疗剂的 pleurocidin 的过量表达以及通过转基因技术(其已在表达抗菌肽的转基因烟草中证实(Jach et al. 1995)并建议用于鱼类(Jia et al. 2000))产生抗疾病的鱼。此外, 由于许多鱼生活在含盐的环境中, 因此其抗菌肽的特性可能与陆地动物产生的不同, 且可在独特的情况下应用。例如, 具有胞囊纤维化的患者的肺粘膜含有升高的 NaCl 浓度, 其可抑制由肺分泌的天然阳离子肽(Goldman et al. 1997)。来自海洋鱼类的盐适应性阳离子肽可应用于这类患者的肺部感染。

Hepcidins

一种鲑鱼 EST (SL1-0412)和一种大比目鱼克隆(Hb7.5)的序列分析显

示了未拼接转录产物的存在,且使得可确定某些内含子的位置(图 16)。与小鼠、人和杂交条纹石鲷相似,鲑鱼 hepcidin 由 3 个外显子和两个内含子组成(Park, Valore et al. 2001; Shike et al. 2002; Pigeon, Ilyin et al. 2001)。鲑鱼与石鲷第一内含子的位置相同,并对应小鼠和人的该序列的两个 5' 氨基酸位置。但是第二鲑鱼内含子和第二大比目鱼内含子 Hb7.5 对应人和小鼠的该序列的两个 3'氨基酸位置和石鲷的多个 5'氨基酸位置。这可能是由于“内含子滑动”,从而在经过一段进化后其内含子的位置发生了几个核苷酸的漂移。有趣的是,WF4 中的缺失准确对应在第一鲑鱼内含子及第二小鼠/人内含子位置,表明一种内含子/外显子的中间结构。

小鼠含有两个 hepcidin 基因,其集簇在基因组上(Pigeon, Ilyin et al. 2001)但在人类(Park, Valore et al. 2001)和杂交条纹石鲷(Shike et al. 2002)中只鉴定到一个 hepcidin 基因。尽管还需对美洲拟鲽和大西洋鲑鱼的 hepcidin 基因数目进行鉴定,但是至少在美洲拟鲽中有 5 个基因,在大西洋大比目鱼中有 5 个,在大西洋鲑鱼中有 4 个基因。由于在 Southern 杂交分析中使用的 hepcidin 探针中没有 *Sst*I 酶切位点,因此本文报道的 5 个美洲拟鲽 hepcidin 基因极有可能集簇在两个基因组片段上。同样存在 pleurocidin 的多基因(Douglas, Gallant et al. 2001)并集簇在基因组上(图 11)。有趣的是,检测的来自大西洋的所有小鲽鱼均出现较小的 4.3 kb 杂交条带,表明它们在基因组水平共有相似性。在太平洋中发现的日本牙鲆表现出单一的 5.5 kb 的杂交条带。

鱼类前原 hepcidin 的推导氨基酸序列可与哺乳动物的全长序列进行对齐但只在对应加工后的肽的部分表现高度的相似性(图 17)。但是,鱼类中的信号肽和原片段同样非常高度保守。在 pleurocidin 家族中也发现这些片段的保守性(Douglas, Gallant et al. 2001)。加工后的肽的氨基末端根据人 hepcidin 的氨基酸序列(Krause, Neitz et al. 2000; Park, Valore et al. 2001)及与加工位点的 RX(K/R)R 基序特性的相似性(Nakayama 1997)进行分配。美洲拟鲽和大西洋鲑鱼的加工后的 hepcidin 分子量范围为 1992 Da (WF2)至 3066 (WF1),与从小鼠、人和石鲷中分离的 hepcidin 相当。除具有酸性 pI (5.54)的 WF2 外,hepcidin 的 pI 在 7.73-8.76。

与 pleurocidin 相似,hepcidin 变体的氨基酸序列在种类间高度相似,

表明一个祖先基因的相对较近的复制。有可能与陆生哺乳动物相比,在鱼生存的水生环境中需要更多不同组抗菌肽存在。此外,这种天生免疫系统的成分在鱼中比在哺乳动物中发挥更主要的作用,哺乳动物具有更高级的进化适应免疫系统。

- 5 人类 hepcidin 分子被认为可以形成含有一系列 β 折叠、环及弯曲的 β -片层的二级结构(Park, Valore et al. 2001)。鱼 hepcidin 的一致二级结构预测表明其含有基本上自由的卷曲结构及一些延伸的链(strand)结构。因而除 WF2、JFL6 和 Hb357 外,所有报道的 hepcidin 含有 8 个半胱氨酸残基,其可形成 4 个二硫键(Krause, Neitz et al. 2000; Park, Valore et al. 2001)并以以下的方式连接: 1-4、2-8、3-7、5-6 (Park, Valore et al. 2001)。WF2 10 中半胱氨酸残基 1 和 3 的缺失表明至少有 1 个二硫键不能形成。

- 使用基因特异引物,我们能够证明在美洲拟鲈(图 20)和大西洋鲑鱼(图 21)的不同组织中均可表达不同的 hepcidin 基因。在大西洋鲑鱼中在正常的未感染的鱼中,主要在肝脏、血液和肌肉中可检测到 hepcidin (I 型), 15 而在鳃和皮肤中量较少(两种类型)。这与 cDNA 文库(该文库构建自未感染的肝脏)中存在 I 型 hepcidin 的 3 个 EST 一致,以及与 cDNA 文库(该文库构建自未感染的肝脏、脾脏和头肾)中不存在 II 型 hepcidin 的 EST 一致。II 型 hepcidin 的表达表现为限定在与水生环境接触的外部上皮表面,而 I 型 hepcidin 表达更加广泛,其可在肝脏、血液和肌肉以及外部上皮表面 20 表达。在未感染的美洲拟鲈中,在任何组织中不能检测到 II 型 hepcidin 的转录产物,但在肝脏和心胃中存在 I 和 III 型 hepcidin 的转录产物。III 型 hepcidin 转录产物还可出现在食道中。

- 也有报道,使用一种小鼠 hepcidin 序列作为探针,通过 Northern 分析发现小鼠 hepcidin 主要在肝脏中表达,而在胃、肠、结肠、肺、心和胸腺中表达较弱(Pigeon, Ilyin et al. 2001)。但是,本研究不能区分两种 25 hepcidin 基因,而且不清楚此两种小鼠基因在小鼠不同的组织表达是否不同。相似地,使用人 hepcidin cDNA 作为探针对人组织和细胞株进行的斑点印记(dot-blot)分析显示,在成年和胎肝中表达较强,而在成年心、胎心和成年脊髓索中表达较弱(Pigeon, Ilyin et al. 2001)。在使用实时定量 30 RT-PCR 的在先研究(Krause, Neitz et al.2000)中显示在人肝脏、心和脑中

hepcidin 的表达较强,而在其它的各种组织中表达较弱。有趣的是,我们在正常的大西洋鲑鱼或美洲拟鲾的脑中、或正常大西洋鲑鱼的心中检测不到型 I 和 II 型 hepcidin 的表达。但是在感染的动物中,II 型 hepcidin 可在两种组织中表达,表明此形式是应激条件下表达的主要的一种。

5 有趣的是,我们发现在大西洋鲑鱼的血细胞中组成型表达的 I 型 hepcidin 的转录产物。据报道在鱼类的血液中很少有组成型表达的非酶抗菌分子;只在彩虹鲟鱼的粘膜中发现有小的疏水性阳离子肽(Smith et al., 2000)及在未感染的动物血液中表达 moronecidin(石鲈的抗菌肽) (Lauth et al. 2002)。有趣的是,相对于未感染的对照动物,感染的鲑鱼血液中没有
10 hepcidin 的表达增加。可能的原因是,在对照动物中 hepcidin 发挥铁离子内环境稳定及抗菌的作用。其在未感染的动物血液中出现是对临近的感染发挥预防作用。

在杀鲑气单胞菌感染过程中大西洋鲑鱼 I 型和 II 型 hepcidin 表达上调,但在不同的组织中表达量不同。在食道、胃、幽门盲肠、肝脏、脾
15 脏、肠、肾脏后叶、直肠和肌肉中 I 型 hepcidin 表达明显上调,而在肾脏前叶和皮肤中表达较低。II 型 hepcidin 在胃、幽门盲肠、肝脏、脾脏、肠、脑、心脏和肌肉中表达明显增加。而在食道、肾脏前叶和肾脏后叶、皮肤及直肠中表达只有较弱的上调。这些结果与细菌刺激的杂交条纹石鲈的报道一致,其中在肝脏中表达明显上调,而在皮肤、鳃、肠、脾脏、
20 肾脏前叶和血液中也证明有表达(Shike et al. 2002)。并不清楚,在杂交条纹石鲈中是否有多种 hepcidin,如果有,其表达是否与大西洋鲑鱼和美洲拟鲾中一样具有表达差异。

对小鼠的研究表明注射 LPS 的小鼠的肝脏中 hepcidin 表达增加 4.3 倍,暴露于 LPS 的原代肝细胞有 7 倍的增加(Pigeon, Ilyin et al. 2001)。这
25 些研究以使用小鼠 hepcidin 序列作为探针进行的 Northern 分析为基础,因此不能区分两种小鼠变体可能的表达差异。对铁的超负载可在小鼠肝脏中发现相似的增加,但对暴露于柠檬酸铁后的原代肝细胞没有增加,其可能是由培养的肝细胞的分化状态不同而导致的。铁负载和 LPS 暴露均可引起 hepcidin 表达增加的事实表明这两种因素在宿主对病原体反应
30 中的重要性。

在感染中，通过各种机制将铁从系统中去除，使得其不能被侵入的病原体使用。有人认为，最近发现的转铁蛋白受体 2 介导了肝细胞对铁的摄取并增加了 hepcidin 的表达(Fleming and Sly 2001; Nicolas, Bennoun et al. 2001)。Hepcidin 依次增加了巨嗜细胞中铁的积累，并通过 $\beta 2$ 微球蛋白、HFE 和转铁蛋白受体 1 增加十二指肠隐窝(crypt)细胞中饮食(dietary)铁的吸收。这些隐窝细胞分化为含有铁转运蛋白量下降的肠隐窝(enterocyte)，由此减少饮食铁的摄取。因此 Hepcidin 可在炎症反应中对铁稳态发挥关键作用，并作为抗菌肽发挥作用。也可能 Hepcidin 可调节肝来源的急性阶段蛋白的表达，并与免疫系统的其它成分一起展现出协同作用。

已证明抗菌肽可在小鼠巨嗜细胞中调节基因表达(Scott, Rosenberger et al. 2000)，并且有可能其可在鱼巨嗜细胞或肝细胞中表现相似的作用。小鼠和人 prohepcidin 中存在功能性核定位信号(连续 4 个 K/R 残基)表明 hepcidin 可作为信号分子在维持这些生物体的铁稳态中发挥作用(Pigeon, Ilyin et al. 2001)。有趣的是，该核定位信号还含有用于加工 prohepcidin 的识别信号，表明核定位只在原片段去除前发生、或该原片段本身被局限于所述核中。硬骨鱼 hepcidin 只含有 4 个 K/R 残基中的 3 个，其不能满足核定位的需要；还需要进行合成的或离体表达的肽的检测来确定 hepcidin 在细胞内信号产生的作用。

总之，通过 Southern 杂交确定了来自不同鱼类的新的 hepcidin 样肽的序列和多种比目鱼类中相关序列的存在。此外，已证明不同型的鱼 hepcidin 在正常鱼(细菌感染的结果)以及在幼鱼的发育中，以组织特异的形式不同地表达，因此提供了鉴定新肽的其它序列的策略。非常明显，在鱼中不同组织以组成或诱导方式产生 hepcidin，表明 hepcidin 变体在不同的环境中可发挥不同的作用。由于它们在哺乳动物的铁稳态中发挥作用，因此有可能鱼 hepcidin 变体可实现这种功能以及杀灭特异病原体的功能。Hepcidin 变体的体外表达可使其抗菌活性范围及其对天生免疫反应的作用得到鉴定。

因此，本发明提供了鉴定潜在抗菌肽的方法。

表

表 1. 用于分离 pleurocidin 样序列的寡核苷酸的核酸序列。

表 2. 用于检测美洲拟鲈不同组织和不同发育阶段的 pleurocidin 样基
5 因表达的寡核苷酸的核酸序列。

表 3. 在 RT-PCR 检测中用来分析 hepcidin 基因表达的引物的核酸序
列。给出了 5'引物设计基础的氨基酸序列。3'引物位于 3'非翻译区(3'UTR)。
表中列出了 PCR 反应中的退火温度及扩增产物的大小。

表 4. 基于基因组和表达数据的 pleurocidin 单字母氨基酸序列。

10 表 4a. 本研究采用的细菌与念珠菌株。

表 5. 使用 PL5'和 PL3'扩增的基因组序列中内含子的大小(bp)。

表 6. 来自皮肤和肠的对应不同的 pleurocidin 基因的 RT-PCR 产物。

表 7. 美洲拟鲈 DNA 的 BamHI 和 SstI 消化产物中用 pleurocidin 探针
杂交的条带大小(kb)。

15 表 8. 针对广谱的细菌病原体和 *Candida Albicans* 的 pleurocidin 样阳
离子抗菌肽的最小抑制浓度。

表 9. 美洲拟鲈和大西洋大比目鱼 hepcidin 样肽的特性。

表 10. hepcidin 表达的 PCR 分析结果。

表 11. 基于基因组和表达数据的某些 hepcidin 单字母氨基酸序列，
20 包括 NRC 参考号。

表 12. 对应表 11 和表 13 所列的氨基酸序列的核酸序列。

表 13. 基于基因组和表达数据的某些 hepcidin 单字母氨基酸序列，
包括克隆名称。

25 附件

附件 I. 参照表 4 的 pleurocidin 样基因和 cDNA 的核酸序列。

附件 II. 参照表 11 的 hepcidin 样基因和 cDNA 的核酸序列。

参考文献

引用的参考文献不是承认或暗示其与本文所公开的任何发明的专利性有关。

5

Amsterdam, D. 1996. Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore.

10 Casteels-Jossen, K. , T. Capaci, et al. (1993). "Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. " EMBO J. 12: 1569-78.

Cohen, S. , M. Skiguchi, J. Stern, and H. Barner. 1963. The synthesis of messenger RNA without protein synthesis in normal and phage-infected thymineless strains of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A
15 Biochem. 49: 699-706.

Cole, A. M. , R. O. Darouiche, et al. (2000). "Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity." Antimic. Ag Chemotherapy. 44 : 2039-45.

20 Cole, A. M. , P. Weis, et al. (1997). "Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. "J. Biol. Chem. 272 (18): 12008-12013.

Douglas, S. E. , C. E. Bullerwell, et al. (1999). "Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*."J. Appl. Ichthyol. 15: 80-86.

25 Douglas, S. E. , J. W. Gallant, et al. (1999). "Winter flounder expressed sequence tags: establishment of an EST database and identification of novel fish genes."Mar. Biotechnol. 1: 458-464.

Douglas, S. E. , J. W. Gallant, et al. (1998). "Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus*."J. Mar.
30 Biotechnol. 6: 214-9.

Douglas, S. E. , J. W. Gallant, et al. (2001). "Cloning and developmental expression of A family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). "Dev. Comp. ImmunoL 25: 137-147.

- 5 Douglas, S. E. , A. Gawlicka, et al. (1999). "Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterisation and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. "J. Fish Biol. 55: 897-915.

Douglas, S. E. , S. C. M. Tsoi, et al. (2002). Expressed sequence tags-a snapshot of the fish genome. A Step Toward the Great Future of Aquatic Genomics, Tokyo, Japan.

Fleming, R. E. and W. S. Sly (2001). "Hepcidin: A putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease."Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (15): 8160-8162.

- 15 Garvan, J. (1996). SeqVu. Sydney, Australia, The Garvan Institute of Medical Research.

Goldman, M. J. , G. M. Anderson, et al. (1997)."Human BETA-DEFENSIN-1 is a salt- sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. "Cell. 88: 553-60.

- 20 Gong, Z. , K. V. Ewart, et al. (1996). "Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, PLEURONECTES AMERICANUS, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. "J. Biol. Chem. 271: 4106-12.

Gudmundsson, G. H. , D. A. Lidholm, et al. (1991). "The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*."J. Biol. Chem. 166: 11510-7.

Hwang, E. -Y., J. -K. Seo, et al. (1999). "Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the skin of the hagfish, *Eptatretus burgeri*. "J. Food Sci. Nutr. 4 (1) : 28-32.

- 30 Jach, G. , B. Gornhardt, et al. (1995). "Enhanced quantitative resistance

against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. "Plant J. 8: 97-109.

Jia, X. , A. Patrzykat, et al. (2000). "Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibria anguillarum* infections."APPL. Environ. Microbiol. 66:
5 1928-32.

Krause, A. , S. Neitz, et al. (2000). "LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. "FEBS Lett. 480: 147-150.

Kuchler, K. , G. Kreil, et al. (1989). "The genes for the frog skin
10 peptides GLAA, xexopsin, levitide, and caerulin contain a homologous export exon encoding a signal sequence and part of an amphiphilic peptide. "Eur. J. Biochem. 179: 281-5.

Lauth, X. , H. Shike, et al. (2002). "Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid
15 striped bass. "J. Biol. Chem. 277: 5030-5039.

LeMaitre, C. , N. Orange, et al. (1996). "Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). "EUR. J. Biochem. 240: 143-149.

Marck, C. (1992). DNA Strider Version 1.2. Service de Biochimie-Bat
20 142, Centre d'Etudes Nucleares de Sacray. Gif-sur-Yvette, France.

Moore, K. S. , S. Wehrli, et al. (1993). "Squalamine : an aminosterol antibiotic from the shark. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1354-1358.

Nakayama, K. (1997). "Furin : a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins.
25 "Biochemical J. 327: 625-635.

Nicolas, G. , M. Bennoun, et al. (2001). "Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (15): 8780-8785.

Oren, Z. and Y. Shai (1996). "A class of highly potent antibacterial
30 peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses

sole fish *Pardachirus marnioratus*."Eur. J. Biochem. 237 (1) : 303-310.

Padros, F., G. Minkoff, et al. (1993). "Histopathological events throughout the development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). "J. Comp. Pathol. 109: 321-4.

- 5 Padros, F. , R. Sala, et al. (1991). Organogenesis in turbot, *Scophthalmus maximus*, larvae related to the main developmental stages: in Larvi'91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society.

- 10 Park, C. B. , J. H. Lee, et al. (1997). "A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicandatus*."FEBS Lett. 411: 173-178.

Park, C. H. , E. V. Valore, et al. (2001). "Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver." J. Biol. Chem. 276 (11): 7806-7810.

- 15 Park, I. Y. , C. B. Park, et al. (1998)."Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*." FEBS Lett. 437 (3): 258-262.

Pigeon, C., G. Ilyin, et al. (2001). "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." J. Biol. Chem. 276 (11): 7811-7819.

- 20 Rivas, L. and T. Ganz. (1999)."EUKARYOTIC antibiotic peptides: not only a membrane business."Drug Discovery Today. 4: 254-6.

- 25 Scott, M. G., C. M. Rosenberger, et al. (2000). "An a-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression."J. Immunol. 165: 3358-3365.

Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C, Burns JC (2002). "Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. " Eur J Biochem: 269: 2232-2237.

- 30 Silphaduang, U. and E. J. Noga (2001). "Peptide antibiotics in mast cells of fish." Nature 414: 268-9.

Smith, V. J. , J. M. O. Fernandes, et al. (2000). "Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Fish Shellfish Immunol. 10: 243-260.

Thompson, J. , D. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence
5 weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res. 22: 4673- 4680.

Trust T. J., Ishiguro, E. E., Chart, H. and Kay W. W. (1983) Virulence properties of *Aeromonas salmonicida*. J. World Maricul. Soc. 14: 193-200.

Valore, E. V. , E. Martin, et al. (1996)."INTRAMOLECULAR inhibition
10 of human defensin HNP-1 by its propiece. "J. Clin. Invest. 97: 1624-9.

Wu, M., E. Maier, R. Benz, and R. E. W. Hancock. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Biochem.
38: 7235-7242.

15

20

25

30

表 1. 用于分离 pleurocidin 样序列的寡核苷酸的核酸序列

引物	氨基酸序列	核酸序列 (5'⇒3')
筛选 cDNA 文库		
PleuroA	FFKKAAHVGKH	TTCTTCAAGAAGGCGCYCAYG T[C/G]GG[C/A]AAGCA
PleuroB	HVGKAALTHYL ¹	CAYGT[C/G]GG[C/A]AAGGCGC YCT[C/G]AA[C/T/A]CAYTACCT
基因组 PCR 与 RT-PCR		
PL1	5'非翻译区	GCCCACTTTGTATTCGCAAG
PL2	3'非翻译区	CTGAAGGCTCCTTCAAGGCG
PL5'	MKFTATF	ATGAAGTTCACTGCCACCTTC
PL3'	KRAVDE ¹	TCATCGACTGCGCGCTT

¹ 互补

5 表 2. 用于检测美洲拟鲈不同组织和不同发育阶段的 pleurocidin 样基因表达的寡核苷酸的核酸序列

基因	引物	氨基酸序列	核酸序列 (5'⇒3')
WF1	RTWF1	KGRWLER	AAGGGCAGGTGGTTGGAAGG
	RTWF1/3'	YQEGEE ¹	CCCTCCCCCTCCTGGTA
WF1a	RTWF1a	RKRKWLR	CGTAAGAGAAAGTGGTTGAGA
	RTWF1a/3'	YQEGEE ¹	CCCTCCCCCTCCTGGTA
WF2	RTWF2	KAAHVG	AAGGCTGCTCACGTTGGC
	PL2	3'非翻译	CTGAAGGCTCCTTCAAGGCG
WF3	RTWF3	FLGALIK	TTCTTAGGAGCCCTTATCAAA
	RTWF3/3'	YDEQQE ¹	CTCCTGCTGCTCGTCATA
WF4	RTWF4	HGRHAA	CATGGTCGTCATGCTGCC
	PL2	3'非翻译	CTGAAGGCTCCTTCAAGGCG
WFYT	RTWFYT	GFLFHG	GGGATTTCTTTTTCATGG
	RTWFYT/3'	SFDDNP ¹	GGGTTGTCATCGAATGAG
WFX	RTWFX	RSTEDI	CGTTCTACAGAGGACATC
	RTWFX/3'	DDDDSP ¹	GGGGCTGTCATCATCATC

表 3. 在 RT-PCR 检测中用来分析 hepcidin 基因表达的引物的核酸序列。给出了 5'引物设计基础的氨基酸序列。3'引物位于 3'非翻译区(3'UTR)。表中列出了 PCR 反应中的退火温度及扩增产物的大小。

类型	引物 产物	氨基酸 序列	核酸序列 (5'⇒3')	退火 温度
(大小) (bp)				
美洲拟鲈				
I 型	HcPA15' 137	WMENPT	TGGATGGAGAATCCCACC	50°C
	HcPA1b 3'	3'UTR	GTGAGGTTGTGTTGCGGG	
II 型	HcPA2 5' 180	GMMPNN	GGGATGATGCCAAACAAC	50°C
	HcPA2b 3'	3'UTR	ACTTGGACTATGGGCTGAG	
III 型	HcPA3 5' 118	WMMPNN	TGGATGATGCCATACAAC	50°C
	HcPA3b 3'	3'UTR	GTTGTTGGAGCAGGAATCC	
Actin	ActF(WF) 312	AALVVD	TCGCTGCCCTCGTTGTTGAC	50°C
	ActR(WF)*	VLLTEAP*	GGAGCCTCGGTCAGCAGGA	
	ActinFI 194	VFPSIV	GTGTTCCATCCATCGTC	50°C
	ActinR1	HTFYNEL	GAGCTCGTTGTAGAAGGTGT	
大西洋鲑鱼				
I 型	HCSS 5' 163	MHLPEP	ATGCATCTGCCGGAGCCT	55°C
	HepLivR	3'UTR	CATTGCAAACATGTACAAACTAG	
II 型	Hep Sp F 163	MNLPMH	ATGAATCTGCCGATGCA	52°C
	HepSpR	3'UTR	GGGCAAATTAAAGGCG	
Actin	Act400F 400	IVGRPRHQ	TCGTCGGTCGTCCCAGGCATCAG	52°C
	Act400R	GYALPHAI	ATGGCGTGGGGCAGAGCGTAACC	

5 *互补

表 4. 用于活性试验的 pleurocidin 样肽序列。依据文中所述的原则, 根据分析得到的翻译后的核酸序列选择最终的肽序列和 c-末端酰胺化形式。

来源	氨基酸序列	编号
美洲拟鲈 (1)	GKGRWLERIGKAGGIIGGALDHL-NH ₂	NRC-01 ^a
美洲拟鲈 (1a)	WLRRIGKGVKIIGGAALDHL-NH ₂	NRC-02 ^{a,d}
美洲拟鲈 (1a-1)	GRRKRKWLRRIGKGVKIIGGAALDHL-NH ₂	NRC-03 ^{a,d}
美洲拟鲈 (2) 2.1	GWGSFFKKAHVGVGKAALTHYL-NH ₂	NRC-04 ^a
美洲拟鲈 (3)	FLGALIKGAIHGGRFIHGMIQNHH-NH ₂	NRC-05 ^a
美洲拟鲈 (4) 1.1	GWGSIFKHGRHAAKHIGHAAVNHYL-NH ₂	NRC-06 ^a
美洲黄盖鲈 YT2	RWGWFKKATHVGVGKAALTAYL-NH ₂	NRC-07 ^b
美洲拟鲈 X	RSTEDIKSISSGGFLNAMNA-NH ₂	NRC-08 ^{b,c}
美洲拟鲈 Y	FFRLLFHGVHHGGGYLNAA-NH ₂	NRC-09 ^{b,c}
美洲拟鲈 Z	FFRLLFHGVHHVGKIKPRA-NH ₂	NRC-10 ^{b,c}
拟庸鲈 AP1	GWKSVFRKAKKVGKTVGGLALDHYL-NH ₂	NRC-11 ^b
拟庸鲈 AP2	GWKKWFNRAKKVGKTVGGLAVDHYL-NH ₂	NRC-12 ^b
拟庸鲈 AP3	GWRTLLKKADEVKTVGKLALKHYL-NH ₂	NRC-13 ^b
美首鲈 GcSc4C5	AGWGSIFKHIFKAGKFIHGAIQAHND-NH ₂	NRC-14 ^b
美首鲈 GcSc4B7	GFWGKLFKLGLHGIGLLHLHL-NH ₂	NRC-15 ^b
美首鲈 GC3.8-t	GWKKWLRKGAKHLGQAAIK-NH ₂	NRC-16 ^b
美首鲈 GC3.8	GWKKWLRKGAKHLGQAAIKGLAS	NRC-17 ^b
美首鲈 GC3.2	GWKKWFTKGERLSQRHFA	NRC-18 ^b
大比目鱼 Hb26	FLGLLFHGVHHVGKWIHGLIHGHH-NH ₂	NRC-19 ^b
大比目鱼 Hb18	GFLGILFHGVHHGRKKALHMNSERRS	NRC-20 ^b

^a 从表达标签和/或由 RT-PCR 和/或原位杂交验证的表达预测的肽

^b 从基因组序列预测的肽

5 ^c 假基因

^d NRC-2 和 NRC-3 均来源于相同序列, 并且后者包括附加的 N 末端片段。

表 4a. 本研究采用的细菌与念珠菌株

种类	ID 号	评述
<i>Escherichia coli</i>	C498, UB1005	DC2 的母体
<i>Escherichia coli</i>	C500, DC2	外膜 - 通透变异
<i>Escherichia coli</i>	C786, CGSC4908	三重营养缺陷(thy, uri, L-his)
<i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium	C587, 14028S	C610 的母体
<i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium	C610, MS4252S	超易感株
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H187, K799	H188 母体
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H188, Z61	超易感株
<i>Enterococcus faecalis</i>	C625, ATCC29212	标准株 (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C622, ATCC25923	标准株 (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C623, SAP017	<u>MRSA</u> 临床分离(来自 Tony Chow - VGH)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	C960, ATCC14990	标准株 (ATCC)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	C621	临床分离(来自 David Speert - Children's)
<i>Bacillus subtilis</i>	C971, ATCC6633	标准株 (ATCC)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	99-1, A449	在 IMB 测序的区域分离种群
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<u>97-4</u>	区域分离种群
<i>Candida albicans</i>	C627, CALB105	酵母试验株

5

表 5. 使用 PL5'和 PL3'扩增的基因组序列中内含子的大小(bp)

基因	外显子	内含子	外显子	内含子	外显子	总数
WF1	154	539	31	95	82	901
WF1a ¹	103	?	31	?	82	?
WF2 ²	100	525	31	108	49	813
WF3	100	374	19	97	64	654
WF4 ²	100	230	31	101	49	511

¹ 由于该序列只能由 RT-PCR 产物表示, 因而不能检测到内含子的大小² 也使用引物 PL1 和 PL2 的扩增序列

表 6. 来自皮肤和肠的对应不同的 pleurocidin 基因的 RT-PCR 产物

皮肤	肠	大小	
条带			
4	n/d ¹	265bp	
WF1			
5	2	175bp	
WF2			
4	9	175bp	
WF3			
n/d ¹	n/d ¹	—	
WF4			
n/d ¹	7	215bp	n/d ²

¹ 未检出

² 基因组 PCR 未检测出(对应 WF1a)

表 7. 美洲拟鲈 DNA 的 BamHI 和 SstI 消化产物中用 pleurocidin 探针杂交的条带大小(kb)

探针	BamHI	SstI
WF1	>24,6	19, 17, 4.5, 4.4, 3.0, 2.9, 2.2,1.3,
x		
WF2	6	19, 17, 4.5, 4.4, 2.9, x 1.3,
x		
WF3	>24	19, 17, 4.5, x 2.9, x 2.2, 1.3, x
WF4	17, 6	19, 17, 4.5, 4.4, 2.9, x 2.2, 1.3, 1.2

x=没有杂交条带证据

表 8. 针对广谱的细菌和 *Candida Albicans* 的 pleurocidin 样阳离子抗菌肽的最小抑制浓度。病原体生长在 Mueller-Hinton 肉汤中并暴露于一定浓度范围的所述特定肽。抑制至少 50%细菌生长的最低肽浓度记录为最小抑制浓度。

	A.sal 99-1	A.sal 97-4	S.typh MS4252	S.typh 14028s	P.aeru K799	P.aeru Z61	E.coil C786	E.coil UB1005	E.coil DC2	S.epi C621	MRSA C623	C.alb C627
	s											
NRC-1	64	64	16	>64	>64	32	32	32	32	>64	>64	64
NRC-2	>128	128	64	>64	64	32	64	64	64	>64	>64	>64
NRC-3	2	4	2	8	2	1	2	8	2	8	8	4
NRC-4	2	2	2	16	8	4	2	4	2	8	8	8
NRC-5	>64	>64	64	>64	>64	32	64	64	>64	32	32	>64
NRC-6	4	4	4	64	16	4	4	4	2	>64	32	32
NRC-7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NRC-8	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
NRC-9	>64	>64	64	>64	>64	64	64	>64	>64	>64	>64	>64
NRC-10	>64	32	16	>64	32	8	32	32	32	32	64	>64
NRC-11	8	8	4	32	32	4	4	16	4	64	>64	32
NRC-12	2	2	2	8	4	1	2	8	2	8	16	4
NRC-13	4	2	2	8	4	1	2	4	2	4	4	4
NRC-14	32	16	16	>64	32	8	16	16	16	16	16	>64
NRC-15	8	16	4	16	8	4	8	8	8	4	4	16
NRC-16	2	1	0.5	16	4	1	1	2	0.5	16	32	8
NRC-17	2	1	1	8	4	2	1	4	1	32	16	8
NRC-18	>64	128	32	>64	>64	64	64	64	64	>64	>64	>64
NRC-19	64	>64	16	64	32	8	32	16	32	8	8	64
NRC-20	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

表 9. 美洲拟鲈和大西洋大比目鱼 hepcidin 样肽的特性

名称	总氨基酸	总半胱氨酸	分子量	pI
WF1	27	8	3066	
	8.75			
WF2	19	6	1992	5.54
WF3	22	8	2367	8.74
WF4	22	8	2256	8.52
Hb5.3	22	8	2363	8.75
Sal8.6	22	8	2331	8.76
Hbl7	22	8	2391	8.76
Hbl1.1	22	8	2391	8.76
Hb357	22	5	2397	7.84
Hb7.5	25	8	2881	8.53
Sal2.1	25	7	2925	8.60
Sal1	25	8	2720	7.73
Sal2	25	8	2881	
	8.53			

表 10.细菌刺激过程中大西洋鲑鱼中 hepcidin 表达的半定量 RT-PCR 分析

组织	I 型 Hecpidin			II 型 Hecpidin		
	对照	感染	比值	对照	感染	比值
食管	nd	0.08	↑	nd	0.09	↑
胃	nd	0.09	↑	nd	0.27	↑ ↑
幽门盲肠	nd	0.14	↑	nd	0.37	↑ ↑
肝	1.19	2.36	2	nd	1.45	↑ ↑ ↑
脾	nd	0.18	↑	nd	0.41	↑ ↑
肠	nd	0.21	↑	nd	0.33	↑ ↑
脑	nd	nd	0	nd	0.50	↑ ↑
血液	0.82	0.84	1	nd	nd	~
肾脏前叶	0.06	0.07	1.2	nd	0.08	↑
肾脏后叶	0.07	0.14	2	nd	0.11	↑
鳃	0.13	0.12	1	0.08	0.07	1
皮肤	0.14	0.18	1.3	0.07	0.09	1.3
卵巢	nd	nd	0	nd	nd	0
直肠	0.07	0.13	2	nd	0.08	↑
心	nd	nd	0	nd	0.43	↑ ↑
肌肉	0.38	0.8	2.1	nd	0.60	↑ ↑

密度测量的像素密度以相对 actin 信号表示。感染的比值为：当两种状态下均获得数值时，可计算出对照。nd, 未检测出；↑ 轻度上调；↑ ↑ 强烈上调

表 11 基于基因组和表达数据的 hepcidin 单字母氨基酸序列

信号肽	阴离子原片断	成熟肽	NRC号
MKTFSAVAVVVLACMFILESTAVPFSEVRTEEVE	IDSVPGEHQPGGTSMLPMHFRFKR-QSHLSLGRWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC201 ^b
MKTFSAVAVVVLACMFILESTAVPFSEVRTEEVE	IDSVPGEHQPGGTSMLPMHFRFKR-QSHLSLGRWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC202 ^a
MKAFSVAWV--LVIACMFILESTAVPFSEVRTEE	VGSFDPVGEHQPGGESMHLPEPRFKR-QIHLSLGLCCNCCCHN-IGCGFCCKF		NRC203 ^a
-----RTEEVE	IDSVPGEHQPGGTSMLPMHFRFKR-QSHLSLGRWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC204 ^a
MKTFSAVAVV--PVIACMFILESTAVPFSEVRTEE	VGSFDPVGEHQPGGTSMLPMHFRFKR-QSHLSLGRWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC205 ^a
MKQFSVAVV--LVMACMFILESTAVPFSEVRTEE	VGSFDPVGEHQPGGESMHLPEPRFKR-QIHLSLGLCCNCCCHN-IGCGFCCKF		NRC206 ^a
MKAFSIAVAVTLVLAFCIQSSAVPFQGVQELEEA	GGNDTPVAEHQVMSMESNMENPRQKRHISHISMERWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC207 ^a
MKTFSAVAVTLVLAFCIQSSAVPFQGVQELEEA	GGNDTPVAEHQVMSMESNMENPRQKRHISHISMERWCNCCCHN-KGCGFCCKF		NRC208 ^b
MKTFSAVAVTLVLFICIQSSGTFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---AFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC209 ^a
MKTFSAVAVTLVLFICIQSSASFPPEAQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC210 ^a
MKTFSAVAVTLVLFICIQSSASFPPEAQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC211 ^a
MKTFSAVAVTLVLFICIQSSATFPE-----	MPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC212 ^a
MKTFSAVAVTLVLFICIQSSASFPPEAQELEEA	VSNDAAEHQETSDS-RI-PYN-RQKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC213 ^b
MKTCVAVTVAVTLVLFICIQSSASFPPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC214 ^b
MKTIsvAVTVAVTLVLFICIQSSASFPPEAQELEEA	VSNDAAEHQETSDSGMI-PYN-RQKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC215 ^b
MKTFSGAVTVAVTLVLFICIQSSASFPPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC216 ^b
MKTSVAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAAHQETSDSWMPYN-RPKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC217 ^b
MKTFSAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RPKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC218 ^b
MKTFVAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC219 ^b
MKTFVAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDSWMPYN-RQKR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC220 ^b
MKTFSAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSDLWMPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCSP-GVCGLCGRF		NRC221 ^b
MKTFSAVAVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSLDSWMPYN-RQKR---GFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC222 ^b
MKTFSAVTVAVTLVLFICIQSSATFPEVQELEEA	VSNDAAEHQETSLDSWMPYN-RHQR---SFKCKFCGCGCRA-GVCGLCCKF		NRC223 ^b

表 12. 参照表 11 的 pleurocidin 样基因和 cDNA 的核酸序列

美洲拟鲈 WF1

ATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTCCTGTTGTTTCATCTTCGTCCTCATGGTTGATCTCGGAGAGGGTCGTCGTAAGAAAAAGGGGTC
 GAAGAGAAAGGGGTCCAAGGGAAAGGGGTCCAAGGGAAAGGGCAGGTGGTTGGAAGGATTGGTAAAGGTAGAGTCACGGAATTAA
 TTTGCTTTTTTACATTGCAAAATATTTTTTCATATAACATTGCTGGAAAATCACAAAAATAAGTAGTCAATATATTTGGCCAAATAGAA
 TCACTTTGATTTCAATAATAATCAAAATAACAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAATGGACATTGTAATTT
 ACTTTGATTCTCACATGCTACGACCTGCTGCAGCAACATTTGAAAATAAATTTGTCCAGAGAGATTTTAAAGTACATTGTTATAGG
 CGATTATCTTTCTATTACTCAGATATTTGTTCAAACCAATAGAATAACTGGATCTCTATGCTAAAATAATAAAACACACATTTCAG
 ATGTTACAGTCAGATTGAACGCTGTTTAAAGTAAAGTATGAACATCCTCTGTATGTATATTTGTTTAACTGGTAACTTTATAGT
 CCTAATAATTGCGTTATGGAAATGTATTAATTGTCATTAAATATAATTTGCTGGAAATTTATCACTGTGTGTTTTTTGTTGTTTTTA
 CACAGCTGGCGGATAATTATCGGGGGGCCCTTGAGTAAGGACTTCTACCATCATTAAGTGTATATTTATAGTTATGATCAGT
 ACAGTTATTAACAACCTTCTCTGTCTGCTGAACCTTCTCCATCAGTCACCTCGGGCAGGGGCAGGTGCAGGGGCCGATTACGACT
 ACCAGGAGGGGGAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

美洲拟鲈 WF1A

ATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTCCTGTTGTTTCATCTTCGTCCTCATGGTTGATCTCGGAGAGGGTCGTCGTAAGAGAAAGTGGTT
 GAGAAGGATTGGTAAAGGTGTCAAGATAATTGGCGGGCGGCCCTTGATCACTCGGGCAGGGGCAGGTGCAGGGGCAGGATTACG
 ACTACAGGAGGGGCAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAAA

//

美洲拟鲈 WF2

GCCCACTTTGTATTCGCAAGGTAATATTGATATTTTTTCATATTCAATTAGACAAATGTGCTCAGCTTGTACTGTATAATGCAAAA
 GTTAATGATCTTTATTTTTTCGTTTTTTTTGTAGAATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTCATGATTGCCATCTTCGTCCTCATGGT
 TGAACCTGGAGAGTGTGGCTGGGGAAGCTTTTTTAAAGGCTGCTCAGCGGTAGAGTCACGAATTAATAGCTTTTTGCTTTGCA
 AATATTTTTTTATAACAGCTGGAAAATCACAAAAATAAATAGTATATATTTTGGCCAAATAAATCACTTTGATTTCAATAATAA
 TCTAAATAACCAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTCTCAATGAATGTACGTTGAGGTTTTATTTGATTCTCACAGCAC
 CAACCTGCTGCGTCAACAATTGAATTCAAATTTGTCCAAAGGAATTCAAAGTAAATTTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATTAC
 TCTGATTTGTTTTTAAATAATAGAAATACTCAATCTCTATGATAAAACAATTACACATACATTCAGATTTTTATAGGACAGATTG
 AAAACTTCTTACAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTAAACATGTAACTAGTCTTACTAATTTGTGTAAAT
 TGTCAATTAATATCAATTGCTTGAGTTATCATTTATGTGTTTTGTTTTTTTTTACAGTTGGCAAGCATGTTGGCAGGCGGCCCC
 TTACGTAAGGACTTCTACCAATTTTACTGTATAATTTGATAGTGTATCACCAGTACTGTTTTTGACAACCTTCTCTATTCCTGCTG
 ACTCTCTCCATCCGACTCATCCGCACTTACCTTGGCGATAAGCAGGAGCTCAACAAGCGGTGCACTCGATGAAGACCCAAATGT
 TATTGTTTTTGAATGAAGAAAT

//

美洲拟鲈 WF3

ATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTGGTGTCTGCTCCTGCTGCTTAATGGCTGAGCCTGGAGAGTGTTCCTTAGGAGCCCTTATCAA
 AGGGCCATACATGGTAGAGTCAAGGAATTAATAGATTTTTTACATGTCAAATTAATGTAGTAAACATATATAAGTAGTCAATATA
 TTTGACCAAGTAGAATCATTTTGATTTCATAATAATCAAATAACAATCTCCAGGCGATTTAATATTTGCAATAATTGGATTTTA
 TAGAATACGGAACAACCTGGATCTTAATGCTAAATAATCCAACATACATTCTGATTTTGGCAGGCAAAATTAACACTACTTTAAA
 GTATGTATAAAACATAATCTGTATGTTATAACAAATACCTCAAGCAATTTGTGTATGGAATGTATTCAATTGTCAATTAATATAAT
 TTGCTTGAGTTTATCATCTGTGTTTTGTTTTGTTTTTTCACAGGTGGCAGGTTTATCCATGGGTAAAGGACTTCTACCATCATGAC
 TGTGTATTTTTAATATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACCTTCACTTGTCTGCTGACTCTCTCCATCAGAATGATCCAAAA
 CCATCACGGTTATGACGAGCAGCAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

美洲拟鲈 WF4

GCCCACTTTGTATTCGCAAGGTAATATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCTTTTGGGAAATCTGCTCAGCTTAT
 TACTGTATAATGCAAAATGTTAATGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTTTTGTAGAATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTCATGATGTT
 CATCTTCGTCCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGGTTGGGGAAGCATTTTTAAGCATGGTCGTCATGGTAAAGTCAAGGAATTAA
 TTAGCTTTTAACTTTGCAAAATATTGTTTTTTTTTAAACAGCTGGAACTCACAAAAATAAATAGCCGATATATTTGGCCAAATTAT
 AATCACTTTGATCTAAATAACAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATAAAATGATTGAACACTACTTAAAGGTATG
 TATAAAACATCATCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGCTGCCAAGCATATTGGCCATGCGAGCGTTAAGTAAAGGACTTCTACC
 ATTATTACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGTATTGTTATTGACAACCTTCTCTTTTCTGCTGATCCGACTCATCCGCGAG
 TCATTACCTTGGCGAGCAGCAAGATCTCGACAGCGCGCAGTCGATGAAGACCCAAATGTTATTGTTTTTGAATGAAGAAAT

//

美洲黄盖鲈 YT2

ATGAAGTTCACGCGCCACCTTCCTCATGATGTGCATCTTCGTCCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGCTTGGGGGAAATGTTTTAA
 AAAGGCCACACACGGTAGAGTCACAGAATTAATAGCTTTTTGCTTTGCAAAATATTTTTTATAACAGCTGGAAAATCACAAAAAT
 AAATAGTCTATATATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGCTTTCAATAAAAAATCAATAACAACCTAAAAGTCCCTTGATTAGCATT
 TTCCATCAATGAATGGACGTTGAGGTTTTATTTGATTCTCATGTCCACCGACCTGCTATGTCAACAATTGAATACAAATTTGTCC
 CAGAGGAATTCAAAGGAAATTTTTCTAGGCGATCTAATCTTCCATTACTCGGATTTGTTTTTAAATATATAGATAAATCAATCT
 CTATGTATAAAATAAACAATACATAGTAAAGATTTTACAAGACAAGATTGAAAACCTTCTTAAAGTACGTATAAAACATCATCTGT
 ATTTATAATTGTTTAACTTTAACAATAAGCCCTACTAATTGTGTTATGGAATGTATAAATGTTCATTAAACATAACTGTTTTGA

GTTTATCATTTATTTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGTTGGCAAGCATGTTGGCAAGGCGGCCCTTACGTAAGGACTTCTACCATCA
TTACTGTATAATTTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACTTCTCTTGTCTGCTGACTCTCTCCATCGACTCATCC
ATAGTGCTTACCTTGGCGACAAGCAAGAACTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

美洲拟蝶 WFX

TARTAAAACCTAATGTGTAAAGTCTTCCACTTTTTTACTGTATTACTTAAACAGAAAATTATTCTCAGATTCTGGAGCTGCAGC
CACTAAGTGTGCTTCTATGAAGTGAATACACAATTGTTCTAACCAACCACTCACCAAATTAACCAGAATCTACAAAGTGAGGAAGTG
AGAGGAGTCGTCCTGTGTTTTCAAATTTTTTGAATGATCTACCACTATGTGAGCTCCTCCTGTATAGCTCTAAATGTTACACAAT
GAATGTGAAGTCAGTTCTGTGTATATAAAGAGTTGCCCTCTGTAGAGCATAACAAGATTTCACCTTTGAATCTCACAAACCTCACT
TTGTATTTCGACAGGTAAGATCGATATTTTTCAAACCTATTAGACGAGACCAAGTATTTGGGAATGTGCTCAGCTTGTCAATGTA
TAATGCAAATGTTAACAATCGTTTTGTTCTTATGTTGTGTTTTGAGGATGAAGTTGCTACTGCTTCTCTGATGTTGTTCCATGGTC
GTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGTGTGTTCTACAGAGGACATCATCAAGTCTATCTGGGTAGAGTCCAGGAATTAATTATAT
CAATAACAATGAATAACAACCAAAAGGCCCTCTGATTAGCATGTTCTTCAATGAATGGTCTGTTTTTATCTATTTTGTATCTCA
CATGCAACGACCTGCTGCGCAACATTTGAAAATCAATCTTTTTTACACAATTCAAAGTACATTGATTTATTCGATTTAATCTTA
ACATTAATCAGATTTGTTTTTGTTTAAATATATCGAATAAAGTGGATCTCTATGATAAATAATTAACATACATTCTTATTTTACC
AATCAAGATTGAACACTTCTTAAAGTACGTATAAATCATCTGTATGTAATAATTGTTTGTATGTTAAGTAAATTTTCCATAA
TTGTGTAATGAAGTATTAATTGTCAATTAATATAATTTGCTTGAATTTATCACCATGTTTTTTTGTGTTTTTAAACAGGT
GGAGGTTTTCTCAATGCGTAAGGACTTCTATCATCTACTGTGTAATTTTATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTAACAGCTT
CTCTGTCTCACTGACTCTCTCCATCAGAAATGAACGCCGTTTCAATGAGCAGCAGGAGCTCAACAAGCGCTCAGATGATGATGAC
AGCCCCAGTCTTATTGTTTTGACTGAAGAAGTCCGCTGAAGGAGCCTTCAGATGATATATTATGCTTCTGCTCTTCAATGAAA
TAAATCAAAC

//

美洲拟蝶 WFY 和 WFZ (来自相同假基因的可选择拼接产物)

GAGCTCGATCAAACCAGACAAGTTGCCCTTCTTCAACAATAGAGTGGAGAGAAAACAGGAGAGGACTTGTATCCTCCTGATG
CTGAGAAGAAGAAATAGAAAGACTTGCAGCATTGATACTTTACTTATACAGAAAACCTATAAACATGACGGGAGCATAGGTTAA
AGTCAAAATACAGAAGGAGAACCAGAAGCCAAAGTCAGCAAAATTTACTGGTATTCTATGATACTGGAGTAAAGGTAAGCATTTTGTATT
CTCAGCAGCAGTGAACCAAAGAGTTTAACTGTACTTGTGTCCAGGTTGAATGAAGTATTGAATAAAAAAACCAAGACAGAACAT
GCATATTTTTTTGGAATGGAATATAAGTCAGGAGAATATGTTGTTGTGTTGGGAGGATCCATCACTGTGCAAGTTAACACAAG
AATTTTTAGAAACATAGATACGATCTCAAGTAACTTCCATTACTATTTGACTTTTTTAAATACTTCAAAATATATTTTAAAA
AGCAACAATAAATCAGAGATAAATCTCATGGAGAAGTCTATATTCATATTTGTGAGCTGAACATTCTATGCTGCTGTTCTATCAT
CTGAGTGTGGAGGCCACTGACGTTTACTGAGCTCAACGCTTACCGCTCTAATGCAATTTGGAGTTAAAGGTAAGCATTTTGTATT
GTCTTCACTGTATTGATACTAAATATACAGGGTTACAAATACAGTTAAACACAGAGAGAGCGGGTGTGGAAGCTTCAGCATCAAT
GTGCTGATGCTGATAGCTGATCTTACCCGACACCGGTGACATGGCATCAAAATGACCACCTCTTTTTCTTCTCTTTTTTTGTA
GGACGAAGTTTCGCTGCCGCTTCTCTGTTGTTTATGTTGTCATGTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTTTTTTAGATTGCTTTTT
CACGGGGTCCACCATGTTAGGGTCCCGAAGTAAATTTGATTATTACATGCCAAATATTTAATGAACATACCTTATGAGTAGTTG
TATTTATTGGACAAGTAGAATCTCTATGATTTTCAGTAGTAAATAGAAATCAAAACCAAAAGGCCCTTTGATTAGCATTTTCTTCAA
TGAAATGGACATTGAGGTTTATTTGATTCTCACATGCTACAGCAACAATTGAATCAAAATTTTTCGAGAGAACTTAATTAAC
ATTGTTGTGCAATAGTCTTAAAGAGTGTACCAATGGAATGGTGTGCGTTTAGGCACTCAATAAATTTGGTTATCAAAATTAAT
AAAAAATTAATATTTAAATATTAATATTAATCATAACTTAAATGTTTAAAGTCTCGCGGGGAACCACTTCTTCTGAAGG
TAAAGGATAGCCAATTTATTGATTAGATCAGTCTCATTTAGATCTAGTTCAAAATAGAAATCTCAATATTTTACCATCGAAGATT
TATAATGAACAGTGAAGTTTATGGAGTTCTAAACAGTGTACAGTTGGCAAGTTTCACTTTGCAATATTAATGACAGACCAATTTG
TGAAAGAAGAACATTTATTATGAGCATAATAAGTATGAAGACAGAAATTAATAACAATCAAAGCTAACTAACAGGACGTGTGT
GGGTGTGTGTGTAATGTAATAAGGGGGGGGCTCAAACCTGTTGGCCTACAGAAAGAGCCTTAAGATAGCAACCAAGGGCTGTA
CCATAAATGTTGTAGTAAAAAGAGTTATTAATAGAGTTAGAATACTAATGACTAATTAGTAGACAACTAGTAGACAACTAA
CACTAACAAATAACAGGAAGTGTGTGTGAGTGTGTTTTGTGTGTAATGTTAAATTAGGGCTCTCAAACCTGGTGTCTTACCAGAG
AGTAAGATAACAATTCCTCCCTTCTTCTGAGGTTGTTTTACGACTGTGCTTTATGCGCGTGGAGGAGGTTAACTCGGTGACA
TGCTATACGTGTCTGTGTAGATGTTAATCAGAGAATGCCAGAGTCAGAGAGACCTACGGAGGAGTCTGTGAAGGGCTATCTAAC
ATTAGCTTTCCTTTAACTTATAACACAATATCAGAAACACATATCAACCTTATAAACACACAGAAATCAATAAACAGTCTTGCT
TAGCATGTATAATTTAAGCCAGATTATGTTACCAGTCCGAGGGAAAGAGTTCAAGTGCAGTTCTGTGACGCTCTCTGCTTGT
TGGTCTGATAGTTCTGCATTGCGGATTCTGTGAGCGCTGTGCTCAGATGCAGGTTGAAGTTCTCTGCGAGGACATCGCGTCTG
CGAGGATTTGTAGAGCTTGAAGGGCGAGGAGATTTCCTTGAGTGGTGAGCTGGAAGCTGAGCTCTGACCTCTGGTTGTGTTG
GAAGAGAAGAAAGCTGGAGCGGCTGTTTCTCCTCTAGCCGATGCAGGAGGAGAGCGGCGAGCCCCACTCTTGAAGAGTTGT
GGAGAGAGATGGGAGCAAGAGCTAGATTTTGGGAGAGCTCTCCTTATATTGGCCCCGATGACCTCACAGGCTTGGAAAGGAGT
GACCAATAGGAGTTGACCTGTTAATCTTGACACCTTTGTGGGACATTTGCAAGACCCAGGACATGCAAGCTCTGTTACAAT
TGGGAGACGAGTTCTTGAAGTCTCAGAACAAATGAGAACCTGTGCGCATCTTGGGGATTGAGTCCACTGAGCAGATGCGGCT
GTTGTTTCAAGTTTGTACTGAAGGAGGCTGTGTTTGGCAAAAACCATGTGTTCCAAACAATTTCTAGGGGATTTAATCTTTA
CATAAATGGATTGTTTTTAAAAATATATAGAATACTCGATCTTCTGCGTAAATAATAAAAAATAAATTCAAATTTGACCAAT
CAAGATTGAACACTAATGAAAAGTACCTATAAAACATAATCTGTATGTATAGTTGTTTGAAGTTTAAATAGTAGTCTTAAACAATG
TGAATGGAATGTTATTCATTGTTCTTTAATACTATTGCTTATCATATGTTGTTGTTGTTTTTACAGGTTGGAGGTTATCTC
AATGCGTAAGGACTTCTACCATCATTAAGTGTGTAATTTGTTATGTTTATCATCAGTACTGTTATTGACAAAGTCTCTTGTCTG
TAGCTGACTCTCTCATCAGATTAACCCAGGGCGGTTACATGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCAGTCAATGACATGACCACT
CAGTGTATTGTTTTTACTGAAGAAGTCGACCTGAAGAATCTTTGAATGATATGAATGTTTGCCTTCAATGAATAAATCA
AACATGACTGGATATTGTTCTTTGCAATGATGATTGTTGAGTGACAGTTGAATAATTTGGAAAACCTTATAACAGATCTCAAT

TTTAGGATGTCAAATCATTCTCTGTGCTTATTCAAATATGAGATTTAACAATGACAAT

//

拟庸鲈 AP1

GCCCACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCGTTTGGGAAATGTGCTCAGCTTGT
TATTGTATAATAACAAAGTTAAGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTGTAGATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGTATGTTGTTTCAT
CTTCCTCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGGATGGAAAAAGTGTGTTTGTAAAGGCTAAGAAAGGTAGAGTCACGGATTAATTA
GCTTTTACATTGCAAAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAAAATCACAAAAATAAGTCGATATATTTGGCCAATTAGAATCACT
TTAATTTCAATAATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGCCCTTGTATTAGCATGTTTCTTCAATGAATGGACATTGAGGTTTATTTT
GATTCACATGACCGACCTGTGGGCAACCATTTGAATTCAGATTTGTCCAGAGAATTCAAAGTACATTTTTCCAGGCGATTA
AATCTTTCCATTACTCAGATTCAAAAATAAATAAATGAATAAATTGAAGCACTATGATAAAATAATTACACATTCACTCTGACTTT
ACAAGTCAAGATTGAACACTATTAAAAAGTGTGTATAAAACAACATCTGTATGCATTAATTTGTTTAACTGTTAATAGTCTAATAAT
TGTTTTATGGAAATGTATTAAATTTACATTTAATATTATTGCTTGAGTTTACCATCATGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGTTGG
CAAGACTGTTGGCGGCTTGGCCCTTGAGTAAGGACTTCTACCATCATTATGATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTA
TTAACTACTTCTCTTGTCTGTCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTCATTACCTTGGCGAGCAGCAGGAGCTTGACAGCGCG
CAGTCGATGAGGACCCAGTGTCTATTGTCTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAG

//

拟庸鲈 AP2

ACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCGTTTGGGAAATGTGCTCAACTTGTATT
GTATAATAACAAAGTTAAGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTGTAGATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGTATGTTGTTTCATCTTC
GTCCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGGATGGAAAAATGGTTTAATAGGGCTAAGAAAGGTAGAGTCACGGATTAATTAGCTT
TTTACATTGCAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAAAATCACAAAAATAAGTCGATATATTTGGCCAATTAGATCACTTTAA
TTTCAATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGCCCTTGTATTAGCATGTTTCTTCAATGAATGGACATTGAGGTTTATTTGATTCTC
ACATGACCGACCTGTGCGGCAACCATTTGAATTCAGATTTGTCCAGAGAATTCAAAGTACATTTTTCCAGGCGATTAATCTTT
CCATTACTCAGATTCAAAAATAAATAAATAAGATAAATTGAAGCACTATGATAAAATAATTACACATTCACTCTGATTTTACAAGTC
AAGATTGAACACTATTAAAAACTGTGTATAGAACATCATCTGTATGTGTATTTGTTTAACTGTTAATAGTCTAATAATTTGTTTA
TGGAATGTATTAAATTTACATTTAATATTATTGCTTGAGTTTACCATCATGTTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGTTGGCAGACT
GTTGGCGGCTTGGCGGTGAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTAACTA
CTTCTCTGTCTGTCTGACTCTCTCCATCCGACTCCTCTGCAGTCATTACCTTGGCAAGCAGCGGAGCTCGACAGCGCGCAGTC
GATGAGGACCCAGTGTCTATTGTCTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTTCAGAA

//

拟庸鲈 AP3

TTGCCCACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCATTTGGGAAATGTGCTCAGCTT
GTTACTGTATAATGCAAAAGTTAAGTATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTGTAGATGAAGTTCACTGCCAACTTCTCATGTTGT
TCATCTTCGTCTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTGGTGGGCAACATTGCTTAAAAAAGCTGGTCACGGAATTATAACGCTTTT
ACATTGCAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAAAATGCAAAAAATAAGTCGATATATTTGGCCAATTAGAATTAATTTGATTT
CAATAATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGCTTGTATTAGCATGTTTCTTCAATGAATGGACATTGAGGTTTATTTTGATTCTC
ACATGACCGACCTGTGCGGCAACAATTGAATTCAGATTTGTCCAGAGAATTCAAAGTAAATTTCCAGGGGATTAATCTTTTC
CATTACTCGGATTTAAAAAATAAATAAATAAGATAAAGTGAATTTGCCATGAAAAATAATTACACATAGTGTCTGATTTTACAAGTC
AAGATTGAACACTACTTAAAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTTGTTTAACTGTTAAACAAATAGTCCAAATAATTTG
GTTATGGAAATGTATTAAATTTGTCATTAAATATAATTTGCTTGAGTTTATCATCATGTTTTTTTTTTTTTTTTACACAGAGGTTA
AGACTGTTGGCAAGTTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTAGTA
CTGACAACTTCTCTCTCCACCAACTCATCCGACAGATTACCTTGGCAAGCAGCGGAGCTCGACAAGCGCGCATTTGATGACGA
CCCCAGTATTATTGTTTTTGAAGTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTTCAGAA

//

美首鲈 GcSc4C5

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCATGATGTTTATGTTGCTCTCATGCTGAACCCGGAGAGGCTGGTTGGGGAAGTATTTCAA
ACATATTTTTCAAGCTGGAAAGTTTATTCATCGGTGCGATTCAGGCACACAATGACCGGAGGAGCAGGATCTCGACAGCGCGCAG
TCGATGA

//

美首鲈 GcSc4B7

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTATGTTGCTCTCATGCTGAACCTGGAGAGGTTTTTGGGGAAGCTTTTGAA
ATTGGGCATGATGGAATCGGGCTGCTCCATCAGCATTGGGTGCTGACGAGCAGGAGCTCGACGAGCGCTCAGAGGAGGAGCG
AGCCCAATGTTATTGTTTTTGAATGAAGAAGTCGATTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首鲈 GC3.8

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTATGTTGCTCTCATGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGCTCCG
TAAAGGTAGAGTCATGGATTTAATTTGCTTTTTACATTGCAAAATCTTTAATATAACATAGTTGGAAAAACCAAAAAATAAGTAGT
CGATATATTTGGCCATATAGAACTCACTTTGATTTCAATAATAATCAAAACAACAATCAAAAAGCCATTGATTAGCATGTCTCCCTTC
ACTAAAATGGACATTGTAATTTAATTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAATCAAAATTTGTTCTCAGAAGA
ATTCAAAGTACATTGTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATTCTATCGGATCTGTTTTTAAAAATATAGAAATAACTGGATCTCTATGTT
AAAATAATAAAACACATCTGATTTTACCTGTCAAGATTGAACAGCACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAA
TTGTTTAACTGTCAACTAATAGTCCAAATAATTTGTTTATGGAAATGTATTCATTGTCTATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCA
CCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGGTGCCAAGCACCTTGGCCAGGCGGCCATTAAATGAAGGACTTCTACCATCATTACTGTG

TAATTTTAAACAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACTACTCTTGTCTCTGTTACTCTCTCCAGGGGTTTGGCCTCTTGGCAA
GAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAATGGATGACGAGCCAGTGCTATTGTTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTT
CA

//

美首蝶 GC3.2

ATGAAGTTCACGCCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCTGCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGTTCAC
TAAAGGTAGAGTCATGGATTAAATTTGCCTTTTACATTGCAAAATACCTTAAATATAACATAGCTGGAAAAATCACAAAAATAGTAGT
CGATATATTTGGCCATATAGAAATCACCTTGATTTCATAATAATCAAAACAATAATCAAAAGCCTATGATTAGCATGTTCTCTTC
ACTAAAATGGACATTGTAATTTATTTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGTGGCAACAATTGAAATCAAATTTGTCTCAGAAGA
ATTCAAAGTACATTGTTCTAGGCGATTAAATCTTTCCATTTCATCGGATTGTTTTCAAAAAATATAGAATAACTGGATCTCTATGTT
AAAATAATAAAACACATTCTGATTTTATCTGTCAAGATTGAACACGACTTAAAGTATGAAATAAAACATCATCTGTATGTATAATT
TTTTAACTGTCAACTAATAGTCCAAATAATTGTTTATGGAAATGTATTTCATTGTTCATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACC
ATGTGCTTTTGTGTTTTTACACAGGTGAAAGGTTATCCACAGGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTATAATTTAATAGTA
TTATCATCAGTACTGTTATTGATAAATCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCCATCAGGCATTTCGCTGACGTCGAGCAGCAGGAGCT
CGACAAGCGCTCAGTGGATGACGAGCCAGTTCTATTGCTTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

大比目鱼 HB26

TTATGAAGTTCACGCCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCTGCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTTTTTTGGGATTGCTTTTT
CAGGGGTCCACCATGTTAGAGTCACGGAATTAATTCGATTTTTACATGGCAATATTTAAGATAACACACCATATGAGTAGTGG
ATATATTTGACCAATTAGAATCACTTTAATTTCAATAATAATCACATAACAATCTCTAGGCCATTTAATCTTTCCATTAAATCGGA
TTTGTTTTTTTAAATATAGAATAACTGGATCTCTATGTTTAAATAATAAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGTACGC
TACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTTAACTAAATAGTCCAAATAATTGTGTAAATGGAAATG
TATTAATTGTCTTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTTGTTTTGTTGTTTTTACACAGTTGGAAAGTGGATCCATGG
GTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTTATTTAATAGTATATCATCAGTACTGTTATGATAATTTCTCTTGTCTCGCTGACT
CTCTCCATCAGACTCATCCATGGGCATCACGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCCGATGAAA

//

大比目鱼 HB18

TTATGAAGTTCACGCCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCTGCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTGGGAATTCCTTTTT
CAGGGGTCCACCATGTTAGAGTCACGGAATTAATTCGATTTTTACATGGCAATATTTAAGATAACACACCATATGAGTAGTGG
ATATATTTGACCAATTAGAATCACTTTAATTTCAATAATAATCACATAACAATCTCTAGGCCATTTAATCTTTCCATTAAATCGGA
TTTGTTTTTTTAAATATAGAATAACTGGATCTCTATGTTTAAATAATAAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACAC
TACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTTAACTAAATAGTCCAAATAATTGTGTAAATGGAAATG
ATTAATTGTCTTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGAGTTTTTGTGTTTTTACACAGGTAGAAAGAGGCGCTTGCA
GTAAGGACTTCTACCATCATTACTTTGTAATTTTATAGTATATCATCAGTACTGTTATGACAACTTCTCTTGTCTCGCTGACT
CTCTCCATCAGGATGAATCAGAGCGTCCGAGTTACGACGAGCGGCAGCAGCAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCCGATGA
AA

//

美洲黄盖鲈 YT2

GOCCACTTTGTAATTCGCAAGGTAAGATCGATATTTTTCAAACCTCATTTAGACGAGACCAAGCATTGTTGAAATGTGATAAGCTTC
TAACTTTATAATGCAAAATGTTAAACAATCTTTTTGTTCTGTTGTTTTGTTAGGATGAGTTGGCTGCGCCTTCTGTTGCTGTTCC
TGGTCTGCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTCTTGGGATTTCTTTTTCACGGTATCCACCATGGTAAAGTCACTCATTTAATA
CATTTTACATGGCAATATTTGAATATAACATACTATATGAGTTGTCAATATATGTGGCCAAGTAGAAGCACTTTGATTTCAATA
ATAATCAAAATAACAATCACTAAGCCATTTAATAATTGAATTAATTACATTTGTTTTAAAAAATATAGAATAACTGGATCTTAT
GCTAAATAATTAACCTAAATTCAGATTTTACCCTCAAGATTAACACTACTTAAAGTATGTAAAAAACAATCATCTGTATG
TATAATTAAATACTAGTCCAGTTAATTGTTTTATGGAAATGTGTTAATTGACATATATCATTTGCTTGAATTTATAATGTGCTTTG
TTTGTTTTTTACACAGGTATCAGGGCGATCCATCAGTAAGGACTTCTACCATCATGACTGTGTTATTTAATAGTATTTATCATCAGT
ACTTTTATTAACAATCTCTTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGTCTCATCCATGGTCAAGATAGCAGCAGCAGCAGGAGCTTG
ACAAGCGCTCAGTCGATGACAACCCCGGTGCTATTGTTTTTGACTGAAGACGTGCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美洲黄盖鲈 YT3

ATGAAGTTCACGCCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCTGCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTCTTTGGAGCCCTTATCAA
AGGGGCCATCCATGGTGGCAAGTTGCTCCATAAATCATCAAAAAAACAATGAACATCACGGTTATGGCAAGCATTGGGGGCTTG
ACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

美洲拟鲈 WF-YT

TTGAAAGTGAGGAAGTGAGAGGAGGACTAGGTCTGTGTTTTTCACTCGTTGAATTTATCTAACACTATCTGAGCCCTCTGCAATA
ACTCTAAATGTTACACAGTACTAGGAAGTCAGTCTGTGTATATAAGAGTTGCATCTGTTGTTATCAGTAGACAAACAGATTACA
CCTTTGAATCTCACAAAGCTCATTTTGTATTGACAGGTAAGATCGATATGTTTCAAACTCATTTAGATGAGACCAAGCATTTTGGG
AAATGTGCTCAGCTTCTAACTGTATGATGCAAAATGTTAAACAATCTTTTGTCTGTTGTTTGTAGGATGAGTTGGCTGCGCCT
TCTGTTGCTGTTCTGTTGCTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGAGTTTTTGGGATTTCTTTTTCATGGTATCCGCCATGGTAGG
GTCACTGAATTGATACATTTTACATGGCAATATTTGAATGTAACATACTATATGAGTTGTCAATATATGTGGCCAAGTAGAAGC
ACTTTGATTTTCAATTAATCAAAATAACAATCACTAGGCCATTTAATAATTGCATTAAATACACTTGTTTTTATATAGAATATAG
AATAACTGGATCTTTATGCTAAAATTAATAAACATGAATTCAGATTTTAAGATTTTCAAGATTGAAAACACTACTTAAAGTATGTA

AAAAACATCATCTGTATGTATAATTAAATACCTGTCCAGATAAFTGTGTGTGGAAATGTGTTAATTGACATATATCATTTGCTT
GAATTTATCATTTATCTGCTTTGTTTTTTTTTACACAGGTATCAAGGCGATCCATGGGTAAGGACTTCTACCTTCATGACTGTGTAT
TTTTAATAGTATTATATTAGTACTGTTATTGAAAACCTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGAATGATCCATGGTAACAGT
TTAGACGAGATGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCATTCGATGACAACCCCAACGCAATTGTTTTTGACTGAAGAAGTCGCCCTGAAGG
AGCCTTCAGATGATATATAATGCTTCTTGCTTTTCAATGAAATAAATTGAATAATTACCCGCAACAGC

//

美洲拟蝶 WF1-样

TACTTTTATCTACCACTATGTGAGCTCCTCCTGTTATACTCTAAATGTTACACAATGAAGATGAGGTCAATTCTGTGTATATAAA
GAGTTGCCCTCTGTATAGTAGACAACATATTTCACTTTGAATCCCAAGAGCTCACTTGTACTCAACAGGTAAGATCGATATTTA
AAAACTAATTTAGACGAAACCRAGCATTTTGGGGAATTTGCTCAACTTCTAAATGTATGATACAAATGTTAAACAATCTTTTATTTT
TGTGTGTGTTTTTGTAGGATGAAGTTCACTGCCACCCTCCTCCTGTTGTTCATCTTCTCCTCATGTTGATCTCGGAGAGGGTC
GTCGTAAAGAAAAGGGGTGGAAGAGAAAGGGGTCCAAGGAAAGGGGTCCAAGGAAAGGGCAGGTGTTGACAGGATTGGTAAA
GGTAGAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTACATTGCAAAATATTTTTCATATAACATTGCTGGAAATACAAAAATAGTAGTCAA
TATATTTGGCCAAATAGAAATCACTTTGATTCAATAATAATCAAAATAACAACCTAAAGGCCCTTGTATGACATGTTTCTTCAAT
GAAATGGACATTGTAAATTTACTTTGATTCTCAATGCTACGACCTGCTGACGCAACATTGAAAATAAATTGTCCAGAAGATT
TAAAGTACATTGTTATAGCGATTATCTTTCTATTACTCAGATATTGTTTCAAAACCAATAGAATAACTGGATCTCTATGCTAAAA
TAATAAAACACACATTAGATGTTACAGTCAGATTGAACGCTGTTTAAAGTAGTATGAAACATCTCTGTATGTATAATGT
TTAACTGGTAACTTATAGTCTTAATAATTGCGTTATGGAAATGTATTAATTGTCAATTAATATAATTGCTGGAATTTATCACTGT
GTGTTTTGTGTTTTTTTACACAGCTGGCGGGATAATATCGGGGGGGCCCTTGAGTAAGGACTTCTACCATCATTAAGTGTAAAT
ATTTATAGTTATGATCAGTACAGTTATTAACAACCTTCTTGTCTCGCTGAACCTTCTCATCAGTCACTCGGGCAGGGGCGAGTG
CAGGGGCCGGATTACGACTACAGGAGGGGGAGGAGCTCAACAAGCGCTCAGACGTTGTTGACAGCCCCAGTCTTATTTTTTTTGA
CTGAAGAAGTCGCCCTGAAGGAGCCTTCAGATGATATATAATGCTTCTGGCTTTTCATTGAAATAAATAACGTTTACCTGCAAC
AGCAACCATG

//

大比目鱼 Hb29

TTATGAAGTTCACCTGCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTGGGAAATTGGATGGGG
CCCCATATCAGCGGTAGAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTCCATTGCAAAATATTTAAZATTGCATAGCTGGAAAATCAGGAAT
AAGTAGTCGATATATTTGGCCAAATAGAAATCACTTTGATTTCATTAATAATCAAAATAACAAATCAAAAAGGCCCTTGTATTAGCATG
TTCCCTCAATAAATGGACATTGAAGTTTATTTGATGCTCAGATGCAACCGCTGCTGGGGCAACAATTGAATCAAAATTTGTCT
CAGAAATTAAGTACATTTTCTAGGTGATTAACTTTCCATTAACTTGATTGTTTTTATAAATATAGAAATCTGGATCTTTA
TGCCAAAATAAATAAACAACACATTTCTGATTTTACCAAGTCAAGATTGAACACTACTTAAAGTAAATATAAACAATCATCTGTATGTA
TAATTGTTTAACTGTTAACAAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAAATGTATTAATTGTCAATTAATATCATTGCTTGAATTCAT
CACCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGGTGAAAGAAGGCCCTGCAAGTAAAGGACTTCTACCATCATTAATTTGTAATTTTA
TAGTATATATCATCAGTACTGTTATGACAACCTTCTTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGGATGAACCTCAGAGCGTCGAGTTAC
GACGAGCGGCAGCAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

大比目鱼 HbSc1A13

ATGAAGTTCACCTGCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTGGGAAATTGGATCGTGG
CCCTATCGGAGGTGAAAAGAAGGCCCTTGACATGAACCTCAGAGCGTCGAGTTACGACGAGCGGCAGCAGCAGCAGGAGCTCG
ACAAGCGCGCAGTCGATGAAA

//

大比目鱼 HbSc1A24

ATGAAGTTCACCTGCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCGTCTCATAGCTGAACCTGGAGAGAGTCTTTTGGAAAGTTTCTCAA
GAAAGTTGTTCATGCTGGCAGCTCAATTGGCGAGACAGCCTTGCAATGTCGCGCAGAGCATCACGGGCTTCATGCGCATCACGGGT
GTCACGGGCGTCACGGGGGTCAAGGCGTCACGGGGGTCAAGGCGTCACGGGCGTCGCGGTTACGACGAGCAGCAGCAGGAGGAG
CTCGACAAGCGCGCATTCGATGA

//

大比目鱼 HbSc1B34

TATGAAGTTCACCTGCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTGGGAAATTGGATGGGGC
CCCATATCAGCGGTAGAAAGAAGGCCCTTGACATGAACCTCAGAGCGTCGAGTTACGACGAGCGGCAGCAGCAGCAGGAGCTC
GACAAGCGCGCAGTCGATGAAA

//

大比目鱼 Hb17

ATGAAGTTCACCTGCCACCTTCTCGGTGTTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGTGTTTTTTGGGATTGCTTTTTCA
CGGGGTCCACCATGGTAGGGTCACGGAAGTAAATTCGATTTTACATGGCAAAATATTTAAATATAACACACCATATGAGTAGTCGAT
ATATTTGGCCAAATTAGAATCACTTTGATTTCATAATAATCAAAATAACAATCTCTAGGCGATTTAATATTGCAATTAATTGGATT
TGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTTATGGTAAAAATAATTAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTA
CTTAGAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATGTTTTAACTGTTAACGAATAGTCCAAATAATTGTTTATGGAAATGTA
TTAATTGTGATTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGTTGGAAGTTGATCCATGGGT
AAGGACTTCTACCATCATTAAGTGTGTTTTTAAATAGTATATCATCAGTACTATTATGACAACCTTCTTGTCTCGCTGACTCT
CTCCATCAGACTCATCCATGGCGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

美首蝶 GC1.2

GCCCACTTTGTATTGCGAAGGTAAGAGCGATATATTTCAAATTCATTGCGATGAGACCAAGCATTGGGAAAATGTGCTCAGCTTGT
TACTGTTTAAATGCAAAATGTTAACAATATCCTTTTCTGTTGTTTTGTAGAAATGAAGTTCGCTGCCGCTTCTCATGATGTTTCAT
GGTCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGGCTCGTTGGGGAACTGTTCTTCAAACATATTTTCAAAGGTAGAGTCACAGAAATTAATTT
GCTTTTACATTGCAAAATATTTTATATAACATAGCTGGAAAATCACAATAATGAAGGCTTGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCC
TTTGATTTCAATAATAATCAAAATAAAAATCAGAAAGGCCCTTGATTAGCATGTTCTTCAATAAAATGGACATTGTAGTTTATTT
TGATTCTCAAATGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAATCAAATTTGTCTCGAACAATTAAAGTACATTTTTCGAGGCAAT
TTAATCTTTCCCTTTGATCGAATTCGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTATGCTAAAAATAATAATCATACATTCTGATT
TTACCAATCAAGATTGAACGCTACTTAAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCCT
AATAATTGTGTATGGAATGTATTCATTGTCTTTAATATCATTGTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTGTTGTTTTACAC
AGCTGGAAGGTTTCATCCATGGGTAAGGACTTTCACCATCATTACTGTGTATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTATTGATA
ACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGTGCATCCAGGCACACANTGACGGCGAGCAGCAGGATCTCGACAAGCGCTCAGT
GGATGATGAGCCAGTGTATTGTTTTTGAATGAAGAAGTTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首蝶 GC1.3

GCCCACTTTGTATTGCGAAGGTAAGAGCAATATATTTCAAATTCATTAGACGAGACCAAGCATTGGGATCTGTGCTCAACTTGT
AATGTTATAATGCAAAATGTTAACAATATTCCTTTTCTGTTGTTTTGTAGAAATGAAGTTCGCTGCCGCTTCTCATGATGTTTCAT
GGTCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGGTGTCTGGATACCTGCCTTGAAATAGGATCTATCATGGTAGAGTCACAGAGTTAATTT
GCTTTTACATTGCAAAATATTTTAAATAACATGGCTGGAAAATCACAATAATGAAGTTCGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCC
TTTGATTTCAATAATAATCAAAAACACAATCAAAAAGGCCATTGTTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGACATTGTAGTTTATTT
TGATTCTGACATGCACCAACTTGTCTGCGGCAACAATTGAATCAAATTTGTCTCAGAAAATTTAAAGTACATTTTCTTCCATT
AGTCGGATTGTTTTTAAAAATACAGAATACTGGATCTTATGCTAAAAATATAATCATACATTCTGATTTTACCAGTCAGAT
TGAACGCTACTTAAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATTGATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCTAATAATTGTGTTAT
GGAATGTATTTCATTGTCTTTAATATCATTGTCTGAAATTTATCACCATGTGTTTTGTGTTTTTACACAGCTCTACTGAGGA
TCAATCGGTAAAGGACTTTCACCATCATTACTGTGTAAATTTAATAGTATTATCATCAGTACTGTATTGATAACTTCTCTGTCTT
GCTGGCTCTCTCCATCAGCCAAATGGTGTATTATCGTGGCACTGGCAGGTGAAGTGCAGCAGCAGGCTCTCGACAAGCGCTCAG
TGGAGGACCAGCCAGTCTATTGCTTCTGCTTGAAGAAGTTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首蝶 GC1.4

GCCCACTTTGTATTGCGAAGGTAAGAGCAATATATTTCAAATTCATTAGACGAGACCAAGCATTGGGATCTGTGCTCAACTTGT
AATGTTATAATGCAAAATGTTAACAATATTCCTTCTGTTGTTTTGTAGAAATGAAGTTCGCTGCCGCTTCTCATGATGTTTCAT
GGTCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGGTGTCTGGATGCTGCTTGAATAGGATCTATCATGGTAGAGTCACAGAGTTAATTT
GCTTTTACATTGCAAAATATTTTAAATAACATGGCTGGAAAATCACAATAATGAAGTTCGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCC
TTTGATTTCAATAATAATCAAAAACACAATCAAAAAGGCCATTGTTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGACATTGTAGTTTATTT
TGATTCTGACATGCACCAACTTGTCTGCGGCAACAATTGAATCAAATTTGTCTCAGAAAATTTAAAGTACATTTTCTTCCATT
AATCGGATTGTTTTTAAAAATACAGAATACTGGATCTTATGCTAAAAATATAATCATACATTCTGATTTTACCAGTCAGAT
TGAACGCTACTTAAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATTGATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCTAATAATTGTGTTAT
GGAATGTATTTCATTGTCTTTAATATCATTGTCTGAAATTTATCACCATGTGTTTTGTGTTTTTACACAGCTCTACTGAGGA
TCAATCGGTAAAGGACTTTCACCATCATTACTGTGTAAATTTAATAGTATTATCATCAGTACTGTATTGATAACTTCTCTGTCTT
GCTGACTCTCTCCATCAGCCAAATGGTGTATTATCGTGGCACTGGCAGGTGAAGTGCAGCAGCAGGCTCTCGACAAGCGCTCAG
TGGAGGACCAGCCAGTCTATTGCTTCTGCTTGAAGAAGTTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首蝶 GcSc4B35

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTCATGGTCTCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGAAAAAGTGGTTAC
TAAAGGTGCCAAGCACCTTGGCCAGGCGGCCATTACGGTTTGGCTCTTGCAGAGAGCAGCAAGAGCTCGACAAGCGCTCAGAGG
ATGACGAGCCAGTGTCTATTGTTTTTGAA

//

美首蝶 GC3.6

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTCATGGTCTCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGAAAAAGTGGCTCCG
TAAAGGTAGAGTCATGGATTAAATTTGCTTTTACATTGCAAAATCTTTAATATAACATGTTGGAAAATCACAATAATAGTAGT
CGATATATTTGGCCATATAGAATCATTGATTTCAATAATAATCAAAACACAATCAAAAAGGCCATTGATTAGCATGTTCTTTC
ACTAAAATGGACATTGTCTATTATTTGATTCTCAGGCGACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAATCAAATTTGTCTCAGAAGA
ATTCAAAGTACATTGTTCTAGGCGATTAAATCTTCCATTTCATCGGATTGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTCTATGTT
AAAATAATAAACACACATTCTGATTTTACCTGTCAAGATTGAACACGACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAA
TTGTTTAACTGTCAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTTCATTGTCTATAATATCATTGTCTGAATTTATCA
CCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGGTGCCAAGCACCTTGGCCAGGCGGCCATTAAATAGGACTTTCACCATCATTACTGTG
TAATTTTAACTAGTATTATCATCAGTACTGTATTGACAACCTACTTGTCTCTGTGACTCTCTCAGGGGTTTGGCTCTTGCAGAA
GAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAATGGATGACGAGCCAGTGTCTATTGTTTTTGAAGTGAAGAAGTTCGCTTGAAGAGCCTTC
AG

//

美首蝶 GC2.2

GCCCACTTTGTATTGCGAAGGTAAGAGCGATATATTTCAAATTCATTAGACGAGACCAAGCATTGGGAAAATGTGCTCAGCTTGT
TACTGTTATAATGCAAAATGTTAACAATGTTTTGTTCTGTTGTTTTTGCAGAAATGAAGCTTCGCTGCCCTTCTGGTGTGTTTCAT
GGTCGTCCTCATGGCTGAACATGGAGAGGGTTTTGGGGATTCTATATGAAGCCTGTTAGAGTCACGGAATTAATTCGATTTTAAAC

ATGGCAAATATTTTACTATAACATACCATATGAGTAGTCGATTAAATTAATTGGATTTGTTTAAAAATATAGAATAATTGGATCT
TTATGCTAAATTAATTAAACATACATTCTGATTTTACCAGTTAAGATTGAACGCTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTA
CATATAATTGTTTAACTGTTAACCAATAGTCCAAATAATTGTGTTGTGGAATGTATTAAATTGTCATTTAATATCATTTGCTTGAA
TTTGTACCATGTGTTGTTGTTGTTTACACAGGTAGAAGATTTCOCATGGGTAAGGACTCTACCATCATCTACTGTGTAATTT
TTAGCAGTATTATCATCAGTACTGTTATGATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTACAGGTACATCAGAAGTCTTATGGTTA
CGACGAGCAGCAGGAGGTGACACAGCGCTCAGTCGATGACAAACCCAGTGCCATTGCTTCTGACTGAAGAAGTGCCTTGAAGGAG
CCTTCAGA

//

美首蝶 GcSc4B28

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGCGAGGGTTATTGGCGCTTCGCAACCA
CCGTGGTGAAAGGTTATCCCAGAGGCATTTCCGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGACGAGCCAGTT
CTATTGCTTTTGA

//

美首蝶 GC3.7

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGAGTGTTTTGGAAATGCTTTTCCACGGGTCC
ACCATGGTCGGGTACGGAAGTAGTTGATTTTACATGGCAAATATTTAAATGAACATACCATATGAGTAGTCGATATATTGG
CCAAGTAGAATCACTTTGACTTCAATAATAATCAAAAACATAATCAAAAAGCCCATTTGATTAGCATGTTCCCTCAATGAATGGAC
ATTGAGGTTTATTTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTCGGCAACAATTGCATTCAATTTGTCCCAAAGAACTTAATTAACA
TTTTCTGGCGATTAAATCTTTGCATAAATTGGATTGTTTTTAAAAATATAGAACTGATCTTTATGCTCAAATAATTAATCA
TACATTCTTATTTATCAGTCANGATTGAACGCTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGATGTATAATTGTTTAACTTTTA
ACTAAAGTCTTAATAATTGTGTTATGAAATGTATTAATTGTCAATTAAATATCATTTCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGT
TTGGTTTTTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTAAGGACTCTTACCATCATCTACTGTATTAATGTTAATAATAGCATTATCATC
AGTACTGTTATGTATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGATTCAACAAAGCTCAGGTCGAGCAGCAGGAGC
TCGACAAGCGCTCAGTGGATGACGAGCCAGTTCTATTGCTTTTGCTGAAGAAGTGCCTTG

//

美首蝶 GC3.1

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTGGATTGATTGCGAC
TGCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTCGATTTTACGTGGCAAATATTTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATA
TATTTGACCAAGTAGAATCATTTGACTTCAATAATAATCAAAAATCAACATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATT
GTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTAATGCTAAAAATAATTAACATACATCTGATATTACCAAGTCAAGATTGAACGCTAC
TTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTGACCTAATAGTCCATAAATGTGTTATGGAAATGTAT
TCATTGTATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTGTTTTTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTA
AGGACTTCTACCATCATCTACTGTATAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATGATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTC
TCCATCAGACTACTCGGCTTTCATCATGGGCCCTCCCGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGT
GGATGAGGAGCCAGTTCTATTGCTTTTGACTGAAGAAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首蝶 GC4.1

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTGGATTGATTGCGAC
TGCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTCGATTTTACTTGGCAAATATTTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATA
TATTTGACCAAGTAGAATCATTTGATTTCATAATAATCAAAAATCAACATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATT
GTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTAATGCTAAAAATAATTAACATACATCTGATATTACCAAGTCAAGATTGAACGCTAC
TTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTGACCTAATAGTCCATAAATGTGTTATGGAAATGTAT
TCATTGTATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTGTTTTTACACAGTTGGAAGGTTGTTCCATGGGTA
AGGACTTCTACCATCATCTACTGTATAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATGATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTC
TCCATCAGACTACTCGGCTTTCATCATGGGCCCTCCCGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGT
GGATGAGGAGCCAGTGCTATTGTTTTTGAATGAAGAAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

美首蝶 GC4.4

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTGGATTGATTGCGAC
TGCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTCGATTTTACGTGGCAAATATTTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATA
TATTTGACCAAGTAGAATCATTTGTTTTCAATAATAATCAAAAATCAACATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATT
GTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTAATGCTAAAAATAATTAACATACATCTGATATTACCAAGTCAAGATTGAACGCTAC
TTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTGACCTAATAGTCCATAAATGTGTTATGGAAATGTAT
TCATTGTATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTGTTTTTACACAGTTGGAAGGTTGTTCCATGGGTA
AGGACTTCTACCATCATCTACTGTATAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATGATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTC
TCCATCAGACTACTCGGCTTTCATCATGGGCCCTCCCGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGT
GGATGAGGAGCCAGTGCTATTGTTTTTGAATGAAGAAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

Petrale 蝶 02A(3)

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGAGTGTTTTGGAAATGCGTTTTCA
CGGGGTCCACCATGGTAGGTCACAAAGTGATTGATTATACATGCCAAATATGTTAATGAACATACCATATGAGCAGTCGTA
TTATTTGGACAAGTAGAATCACTTTGATTTCAATAGTAATTAATAAACAATCAAAAAGGCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATG
AATGGACATTGAGGTTTATTTGATTCTCACCCTGCATCGACCTGCTGCGGCAACTATTGAATCAAAATTTGCCAGAGAACT

AAATTAAACATTTTCTAGGCCATCTAATCTTTGCATGAATTGGATTGCTTTCAAAAATATAGAATAACTGGATATTTATGCTAAAA
TAATAAAAACACACATTCTGATTTTACAGTCAGATTGAACACTACTTAAAGTACCTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTG
TTTGACTTTTAAACAAATAGTCAAAATGATTGTTATGGAATGCAATTAATTGTCTTTTATATCATTTTACTTGAATTTATCACCATG
TGTTTGTGTTTGTGTTTGTAGCAGGTGGAGGTTTCTCAATGCGCAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTAAATTTAATAGTATTATC
ATCAGTACTCTTATTGACAACGCTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCTATCAGATTAAACCCAGGGTATCGCGGTACGACGAGCAGC
AGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

Petrale 蝶 02B

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTCTTGGTGGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTCTTTGGAGCCCTTCTCAA
AGGTAGAGTCACGGAATTAATTTGATGTGTACATGGCAAATAATTTGTATAACATATCATATGACGAGTCGATGTATTTGACCAA
GAGGAATCATTTTGATTTCAATAATTAATCAAAATAACAATCTCTTGGAGATTATTTATTTGCAATTAATGGATTTTATAAAATATA
GAACAACCTGGATCTTAATGCTAAAATAATTAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAAATTAACCACTACTTTAAAGTATGTATA
AAACATCATCTGTATGTTTAAATGTTTAACTTTTAAACAAATAGTCCAAATAATTTGTGTAAATGGAATGTATTCAATGTGCATATAAT
ATAGTTTGGCTTGACTTTTATCACCCTGTGTTTGTGTTGTTTTTTCACAGGTGCCAGGCGCTCCATGGGTAAAGGACTTCTACCATC
ATGACTGTGTAAAGTTTAAATAATTTATCATCAGTACTGTTATTAAAGACTTCTCTTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGAATCATC
ACAATGCTGTGTACGCTTACGACGAGCAGCAGGAACCTCAACRAAGCGCGCAGTCGATGA

//

Petrale 蝶 PL1/2/2.1

GCCCCCTTTGTATTGCGAAGGTAAAGATCAATATTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCGTTTGGCAATGTGCTCAGCTTGT
TATTGTATAATAACAAAGTTAACGATCTTTATTTTCTGTTTTTGTAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGTATGTTGTTTCAAT
CTTCTGCTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTGTTTGGAAAGATTGGTTTCTGTAAGGCTAAGAAAGGTAGAATCAAGGAATTAATTA
GCTTTTACATTGCAATAGATTTTATAACAGCTGGAAATCAAAAAATAAATAGTGTATATTTGGCCAATTAGAATCACTT
TAATTTCAATAATAATCTAAATAACAACTTAAAGGCCCTTGTATAGCATGTTCTTCAATGAAAAGGACATGAGGTTTATTTG
ATTCTCACATGCACCGACCTGTGCGGCAACAAATTGAATTCAGATTGTCCAGAGAATTCAAAGTACATTTTCCAGGCGATTAA
ATCTTTCCATTACTCGGATTTAAAAATAAATAAATAAGAAATACTGAAGCGCTATGTAAAATAATTACACATTCATTCTGATTTTA
CAAGTCAAGATTGAACACTATTAAAAAGTGTGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTTGTTTAACTGTTAATAGCTTAATAAT
GTGTTATGGAAATGTATTAAATTTACATTTAATATCATTTGCTTGAAGTTTACCATCATGTTTGTGTTTGTGTTTACACAGTTGGC
AAGACTGTGCGGCTTGGCCCTTAAAGTAAGAACTTCTACCATCATTAAGTGTATAATTTGTATAGTATTATCACCAGTACTGTAT
TAAGTACTTCTTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCCGAGTCATTACCTTGGCGAGCAGCAGGAGCTTGGCAAGCGC
GCAGTCGATGACGACCCAGTGTTTATGTCTTTGACTGAAGAAGTCCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

英吉利蝶 05A

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATTTTAAATCTTGTCTCATGGTGAACCTGGAGAGTGTGTTATAGGAAATGGTTTAA
AAAGGCTGCTCAGGTAAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTCGTTTACAAATATTTTATATAGCAGCTGGAAATCACAAAAAT
AAATAGTCGATGTATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGATTTCAAATAATTAATCTAAATAGCAACCTTAAAGGCCCTTGTATAGCAT
GTTCTCTCAATGAATGGAATGTGAGGTTTATTTGATTTCTCACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAAATTGAATTCAAATTTGTC
CCAAGGAATTCAAAGTAACTTTCTAGATGATTTAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTAAAAATATATAATAACTCAATC
ACTATGATAAATAATAACACATACATTCTGATTTATACAGACAGATTGAAAACCTTCTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTG
TTGTATATAATTTGTTTATCATTTTCAAAAAAGTCCAATAATTGTTTATGGAATGTATAAATTTGTCATTAAATATAATTTTGTG
AGTTTATCAATATGTGTTTTGTTTGTGTTTACACAGTTGGCAAGGAAGTTGGCAAGGTGGCCCTTAAAGTAAGGACTTCTACCATTA
TTACGTATAATTTTGTATGATTTATCACCCGTAAGTGTATTGACAACTTCTCTTTCTGCTGACTCTCTCCATCTGACTCATCT
GCAGTGTCTTGCTTGACAGCAGCAGCAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

英吉利蝶 PL1/2/5

GCCCCCTTTGTATTGCGAAGGTAAATATCGATATTTTCAAACCTCATTTAGACGAGACCAAGCATTTGGGAAATGTGCTAAGGTTGT
TACGTATAATGCAAAATTAATGATCTTTATTTTCTGTTTTTGTGCAATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATTTTAA
TCTTCTGCTCATGTTGCAACCTGGAGAGTGTGTTTGAAGAAATGGTTTAAAAAGGCTGTTACCGGTAGAGTCACGGAATTAAT
TGCCTTTTGTCTTACAAATATTTTATATAGCAGCTGGAAATCAAAAAATAAATAGTCGATGTATTTGGCCAATTAGAATCACT
TTGATTTCAATAATAATCTAAATAGCAACCTTAAAGGCCCTTGTATAGCATGTTCTTCAATGAAATGGATGTTGAGGTTTATTT
GATTTCTACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAAATGAATTCUATTTGTCCCAAGGAATTCAAAGTAACTTTTCTAGGCGATT
TAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTAAAAATATATAAATACTCAATCCCTATGATAAAATAAACAACATACATTCTGATTT
ATACAAGACAAGATTGAATACTTCTTGAAGTATGTATCAACATCATCTGTTTGTATAATTTGTTAACAGTTTCAAAAAAGTCCA
ACTAATGTGTTATGGAATGTATAAATGTCAATTAATAAATTTTTGAGTTTATCAATATGTGTTTTGTTGTTTTTACACA
GTTGGCAAGAAAGTTGGCAAGGTGGCCCTTAAAGTAAGGACTTCTACCATTATTACTGTGTAAATTTGTATAGTATTATCACCAGTAC
TGTTATTGACAACCTTCTCTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTGCTTACCTTGGCGAGCAGCAGCAGCTCGAC
AAGCGTCAGTCGATGAAGAGCCAGTGTTATTGCTTTTGAAGTGAAGAAGTCCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

箭齿蝶 09A

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATGTTTCTCTGCTCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGTTTGGAGGAAATGGATTAA
AAAGGCTACTCAGGTAAGTCACGGAATTAATTCGTTTTTGTCTTTGCAAAATATTTTATATAACAGCTGGAAAGTCACAAAAA
TAAATAGTCAATATTTTGGCCAATTAGAATCACTTTGAGTTGAATAATTAATCTAAATAACCAACCAAAAGGCCCTTCTCTTAAATG
AAATGTACGTTGAAGTTTATTTGAAATCTCACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAAATTGAATTCAAATTTCTCCAGAGGAATTC
AAAGTAAATTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATTACTCTGATTTGTTTTAAATATATAGAATGACTCAATGTCTATGATAAAT

ATAAGCCATACATTCTGATTTTTTACAAGACAAGATTGAAAACCTCTTAAAGTACGTATAAAACATCATCTGTATTATAATTGT
TTACATTTAACAAATTGTCCTACTAATTGTGTATGGAAATGTATAAATTGTCTTAAATATCATTTGCTTGAGTTTATCATTAT
TTGTTTTTGTGTGTTTTTACACAGTTGGCAAGCATATTGGCAAGCGGCCCTTGGTAAAGAACCTCTACCATCATTACTGTATAAT⁶
TTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACTTCTCTTGTCTGATGACTCTGTTATCCAACTCATCTGCAGTGCTTACA
TTGGCGGGAAGCAAGAACTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

格陵兰大比目鱼 12B

ATGAAGTTTCACGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTTCGGATTGCTTTTTCA
CGGGATCCACCATGGTAGGGTCAACGGAATTAAATTAGATGTTTACATGGCAATATTTTAAAGATAACACACCATATGAGTAGTCGAT
ATATTGACCAATTAGAATCACTTTAATTTCAATAATAATCACATAACAACTCTCTAGGCCATTAAATCTTCCATTAAATCGGATT
TGTTTTTTTAAATATAGAATAACTGATCTTTATGCTAAAATAATGAACATACATTCTGATTTTACCCAGTCAAGATTGAACGTTA
CTTAAAGTATGTTTTAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAGCTGTAAACAAATAGTCCAAATAATTGTTTATGGAAATGTA
TTAATTGTCTATATAATAATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTAAACACAGCTGGAAAGTTGATCCATGG
GTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTAACTTCTCTTCTATCGCTGACT
CTCTCCATCAGACTCATCCATCATGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

太平洋大比目鱼 15A

ATGAAGTTTCACGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTGGGAAATTGGATGGGGCC
CCATATCAGCGGTAGTACCGGAATTAAATTGCTTTTTTCCATTGCAAAATATTTAATATTGCATAGCTGGGAAATCAAGAAATAA
GTAGTCGATATATTTGGCCAATAGATAACTTTGATTTCAATAATAATCAAAATTACAAATCAAAAAGGCCCTTGGATTAGCATGTT
CCTTCAATAAAATGGACATTGAAGTTTATTTTGATGCTCACATGCCAGCCTGCTGCGGCAACAAATTGAATCAAAATTGTCTCA
GAATTTAAAGTACATTTTCTAGGTGATTTAATCTTTCCATTCTCTGATTTATTTTATAAATATAGAATAAAGTATCTTTCTGCT
TAAATAATAAAACACACATTTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATA
ATTGTTTAACTGTTAAACAATAGTCCAAATAATTGTTTAAAGGAATGTATTAATTGTCTTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCA
CCATGAGTTTTTTGTTTTGTTTTTACACAGGTAGAAAGAGGCCCTGCGAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTTTGTAATTTTATA
GTATATCATCAGTACTGTTATTGACAACFTCTCTGCTCTGCTGACTCTCTCCATCAGGATGAACCTCAGAGCGTCCAGTTACGA
CGAGTAGCAGCAGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

太平洋大比目鱼 15B

ATGAAGTTTCACGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGTGTTTTTTGGGATTGCTTTTTTCA
CGGGTCCACCATGGTAGGGTCAACGGAAGTAATTCGATTTTTTACATGGCAATATTTTAAAGATAACACACCATATGAGTAGTCGAT
ATATTGATATATTAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCAAAATAACAACTCTCTAGGCCGATTTAATATTTGCATTAAATTGGATT
TGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGATCTTTATGGTAAAATAATTAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTA
CTTAGAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTAACTAATAGTCCAAATAATTGTTGTTATGGAAATGTA
TTAATTGTCTTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGTTGGAAATTTGATCCATGGGT
AAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACCTCTCTTGTCTGCTGACTCT
CTCCATCAGACTCATCCATCAGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

C-O 鲽 PL1/2/6

GCCCACCTTTGTATTGCGAAGGTAATATCGATATTTTTCAAACCTATTAGACGAGACCAGGCATTTGGGAAACGTGCTAAGGTTGTTACTG
TATAATGCAAAATTAATGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTTTGCAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCATGATTTTAAATCTTCGTCTCT
CATGGTTCGAACCTGGAGAGTGTGGTATTAGGAAATGGTTTTAAAAAGGCTGCTCACGGTAAAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTGCTTTAC
AAATATTTTTTACAGCAGCTGGAAATCACAAAAATAAATAGTCTGATGTATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCTA
AATAGCAACCTTAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCCCTTCAATGAAATGGGTGTTGAGGTTTATTTTGATTCTCACATGCACCGAACCTGCTG
CGGCAACAATTGAATTCAAATTTGTCCAAAGGAATTCAAAGTAAACCTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTTA
AAAAATATAATAACTCAATCGCTATGATAAAATAATAACACATACATTCTGATTTATACAGACAAGATTGAAAACCTCTTGAAGTATG
TATCAAAACATCATCTGTTTATATAATTGTTTAAACATTTACAAAAGTCCAACTAATTGTGTTATGGAAATGTATAAATTGTCATTTAATA
TAATTTTTTTGAGTTTATCAATATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGTTGGCAAGAAAGTTGGCAAGGTGGCCCTTAAGTAAAGGACTTCTA
CCATTATTACTGTATAAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACCTTCTTTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATC
TGCAGTGCTTACCTTGGCGAGCAGCAGCAGCTCGACAAGCGTGCAGTCGATGAAGAGCCAGTGTTATTGCTTTTTGACTGAAGGAGTCGCC
TTGAAGGAGCCTTC

//

表 13

克隆名称	信号肽	阴离子原片段	成熟肽
Hal7.5	MKTFSAVAVVVVLA	CMFILESTAVPFFSEV	RTVEEVESIDSPVGEHQ
Sal14.1	MKTFSAVAVVVVLA	CMFILESTAVPFFSEV	RTVEEVESIDSPVGEHQ
Sal1	MKAFSAVV--LVIA	CMFILESTAVPFFSEV	RTVEEVESIDSPVGEHQ
Sal2	-----RTEEVES	IDSPVGEHQPGGTS	MNLPMHFRFKR-QSHLS
Sal2.1	MKTFSAVV--PVIA	CMFILESTAVPFFSEV	RTVEEVESIDSPVGEHQ
Sal2.4	MKQFSVAVV--LVMA	CMFIVESTAVPFFSEV	RTVEEVESIDSPVGEHQ
WF1	MKAFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
JapF2.4	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
WF3a	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
WF3b	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
WF4	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
WFD1.1	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
WFD1.4	MKTFSAVAVTLVLA	FVCIQSSAVPFFQVQ	LEEAAGNDTPVAHQVMS
AP5.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP5.3	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP5.4	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP5.5	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP6.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP6.2	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP6.4	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
AP6.3	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Sal8.6	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal7.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal7.4	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal8.2	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal8.3	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal5.3	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
Hal1.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
WF2	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
YT11.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
YT12.1	MKTSVAVTVAVLV	LFVCIQSSATFFPEVQ	LEEAASNDNAAAEHQ
GC9.3	-----	-----	-----

附件 I. 参照表 4 的 pleurocidin 样基因和 cDNA 的核酸序列

NRC-01

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCTGTTGTTTCATCTTCGTCCTCATGGTTGATCTCGGAGAGGGTCGTCGTAAGAAAAAGGGTCG
AAGAGAAAGGGGTCCAAGGGAAAGGGGTCCAAGGGAAAGGGCAGGTGGTTGGAAAGGATTGGTAAAGGTAGAGTCACGGAATTAATT
TGCTTTTACATTGCAAAATATTTTTCATATAACATTGCTGGAAAATCACAATAAAGTAGTCAATATATTTGGCCAAATAGAAATCA
CTTTGATTTCAATAATAATCAAAATAACAACCTAAAAGGCTTTGATTAGCATGTTCCCTCAATGAAATGGACATTGTAATTTACTT
TGATTCTCACATGCTACGACCTGCTGCAGCAACATTTGAAAATAAATTTGTCCAGAAGATTTTAAAGTACATTGTTATAGGCGATT
TATCTTTCTATTAATCAGATATTTGTTCAAACCAATAGAAATACCTGATCTCTATGCTAAAATAATAAACACACATTAGATGTTA
CCAGTCAAGATTGAACGCTGTTTAAAGTAAGTATGAAACATCCTCTGTATGTATAATTGTTAACTGGTAACCTATAGTCTCTAATA
ATTGCGTTATGAAAATGTATTAATTGTCATTTAATATAAATTTGCTGGAATTTATCACTGTGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGCTG
GCGGATAAATTATCGGGGGGGCCCTTGAGTAAGGACTTCTACCATCATTAAGTGTATATTTATAGTTATGATCAGTACAGTTATT
AACAACTTCTCTGTCTCGTGAACCTCTCCATCAGTCACCTCGGGCAGGGGCAGGTGCAGGGGCCGATTACGACTACCAGGAGGG
GGAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

NRC-02 和 NRC-03

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCTGTTGTTTCATCTTCGTCCTCATGGTTGATCTCGGAGAGGGTCGTCGTAAGAAAGTGGTTG
AGAAGGATTGGTAAAGGTGTCAAGATAATTGGCGGGCGGCCCTTGATCACCTCGGGCAGGGGCAGGTGCAGGGGCAGGATTACGAC
TACCAGGAGGGGCAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

NRC-04

GCCCACTTTGTATTTCGAAGGTAATATTGATATTTTTTCATATTCAATTAGACAAATGTGCTCAGCTTGTACTGTATAATGCAAAAG
TTAATGATCTTTATTTTCTGTTTTTTTTGTTAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCATGATTGGCATCTTCGTCCTCATGGTTG
AACCTGGAGAGTGTGGCTGGGAAGCTTTTTTAAAGGCTCTCAGGTAGAGTCAAGAAATTAATTTGACTTTTGTAGTTTCAAAAT
ATTTTTTTTATAACAGCTGGAAAATCACAATAAATAGTATATATATTTGGCCAAATAAATCACTTTGATTTCAATAATAATCTA
AATAACAACCTAAAAGGCTTTGATTAGCATGTTCTCTCAATGAAATGTACGTTGAGGTTTATTTTGTCTCACAAGCACCACCT
TGCTGCGTCAACAAATGAAATCAAAATTTGTCCAAAGGAATCAAAGTAAATTTTCTAGGCGATTAACTCTTTCCATTACTCTGAT
TTGTTTTTAAATATATAGAAATACTCAATCTCTATGATAAAACAATTACACATACATTAGGACAAAGATTGAAAACCT
CTTACAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAAACATGTAACAACTAGTCTACTAATTTGTGTAAATTTGTCATTT
AATATCAATTTGCTTGTGTTTATCATTTATGTGTTTTGTTTTTTTTTACACAGTTGGCAAGCATGTTGGCAAGGGCGCCCTTACGTAAG
GACTTCTACCAATTTTACTGTATAAATTTGATAGTGTATACACAGTACTGTTTTTGACAACCTCTCTATTCTCTCTGACTCTCTCCA
TCCGACTCATCCGAGTCATTACCTTGGCGATAAGCAGGAGCTCAACAAGCGTGCAGTCGATGAAGACCCAAATGTTATTGTTTTTG
AATGAAGAAAT

//

NRC-05

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCTGTTGCTGTCTCTGTTGCTCTTAATGGCTGAGCCTGGAGAGTGTCTTTAGGAGCCCTTATCAAA
GGGGCCATACGGTAGAGTCAAGGAATTAATTAGATTTTACATGTCAAATATGTAGTAGAACATATAAGTAGTCAATATATT
TGACCAAGTAGAATCATTTTGTATTCAATAATAATCAAAATAACAATCTCCAGGCGATTAAATATTGCAATTAATTTGGATTTTATAG
AATACGGAACAACCTGGATCTTAATGCTAAAATAATCCAACATACATTCTGATTTTCCAGGCAAAATTAACACTACTTTAAAGTAT
GTATAAAACATAATCTGTATGTTATAACAAATACTCCAAGCAATTTGTGTGATGGAATGTATTATTGTCATTTAATATAAATTTGCT
TGAGTTTATCATCTTTGTTGTTTTGTTTTTTTACACAGTGGCAAGCATTTATCCATGGGTAAGGACTTACCATCATGACTGTGTGTA
TTTTTAATATTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACCTCACTTGTCTCGTCTGACTCTCTCCATCAGAATGATCCAAACCATCAC
GGTTATGACGAGCAGCAGGAGCTCAACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

NRC-06

GCCCACTTTGTATTTCGAAGGTAATATCAATATTTTTCAAATTCATTTAGACGAGACCAACCTTTTGGGAAATCTGCTCAGCTTATT
ACTGTATAATGCAAAATGTTAATGATCTTTATTTTCTGTTTTTTTTTGTAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCATGATGTTCA
TCTTCTCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGTTGGGGAAGCAATTTTAAGCATGGTCTGTCATGGTAAAGTCACGGAATTAATTA
GCTTTTAACTTTGCAAAATATTGTTTTTTTTTAAACAGCTGGAAACTCACAATAAATAGCCGATATATTTGGCCAATTATAATC
ACTTTGATCTAAATAACAACCTAAAAGGCTTTGATTAGCATGTTTCTTCAATAAATGATTGAACACTACTTAAAGGTATGTATAA
AACATCATCATGTTTTGTTTTGTTTTTTTACACAGCTGCCAAGCATATTGGCCATGCAGCGTTAAGTAAGGACTTCTACCATATT
ACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGTATTGTTATTGACAACCTCTCTTTTCTGCTGATCCGACTCATCCGAGTCATTAC
CTTGGCGAGCAGCAAGATCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAAGACCCAAATGTTATTGTTTTTGAATGAAGAAAT

//

NRC-07

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCTCATGATGTGCATCTTCGTCCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTCTTGGGGGAAATGGTTTAAA
AAGGCCACACCGTAGAGTCACAGAATTAATTAGCTTTTTGCTTTTGCATAATATTTTATAACAGCTGGAAAATCACAATAAATAA
ATAGTCTATATATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGCTTTCAATAAAAAATCTAAATAACAACCTAAAAGTCTTTGATTAGCATTTTC
CATCAATGAAATGGACGTTGAGGTTTATTTTGTATTCTCACATGCACCGACCTGCTATGTCAACAATTGAATACAAATTTGTCCAGA
GGAATTCAAAGGAAATTTTTCTAGGCGATCTAATCTTTCCATTACTCGGATTTGTTTTTAAATATATAGAATACTCAATCTCTATG
ATAAAATAATAACATACGTAAAGATTTTACAAGACAAGATTGAAAACCTTCTTAAAGTACGTATAAAACATCATCTGTATTAT
AATTGTTTAAACATTTAAACAAATAGCCCTACTAATTTGTTGTTTATGGAATGTATAAATTTGTCATTAAACATAAATTTTGTAGTTTATC
ATTATTTGTTTTTGTGTTTTTACACAGTTGGCAAGCATGTTGGCAAGGCGGCCCTTACGTAAGGACTTCTACCATCATTAATGTA
TAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACCTCTCTTGTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCCATAGTGCTT
ACCTTGGCGACAAGCAAGAACTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

NRC-08

TAATAAACTAATGTGTAAAGTCTTCCACTTTTTTACTGTATTTACTTAAACAGAAATTAATCTCACGATTCTGGAGCTGCAGCC
ACTAAGTGTGCTTCATGAAGTGAATACAAATTTGTTCTAACCAACCTCACCCAATTAACCAGAATCTACAAAGTGAGGAAGTGAG
AGGAGTCGTCCTGTTTTCAAATTTTTGAATGATCTACCACTATGTGAGCTCCTCTGTTATAGCTCTAAATGTACACAAATGAA
TGTGAAGTCAGTTCTGTGTATATAAAGAGTTGCCCTCTGTAGAGCATACAACAGATTTACCTTTGAATCTCACAACCTCACTTTGT
ATTGCAAGGTAAGATCGATATTTTTCAAACCTATTAGACGAGACCAAGTATTGGGAAATGTGCTCAGCTTGTCAATGTATAATG
CAAATGTTAACAATCGTTTTGTTCTTATGTTGTGTTTGTAGGATGAAGTTGCTACTGCTTCTCTGATGTTGTCCATGGTCTGCTC
ATGGCTGAACCTGGAGAGTGTGTTCTACAGAGGACATCAAGTCTATCTCGGTAGAGTCCAGGAATTAATTTATTAATCAATAC
AATGAATAACAACCAAGGCTCTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGTCTGTTTTTATCTATTGATTTCTACATGCAAC
GACCTGCTGCGGCAACATTTGAAAATCAATCTTTTTTACACAAATTCAAAGTACATTGATTTATTGATTTAATCTTAACATTAATC

//NRC-09和NRC-10(来自相同假基因的可选择拼接产物)

11

GCCCACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCGTTTGCGAAATGTGCTCAGCTTGT
 ATTGTATAATAACAAGTTAACGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTTGTAGAATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGTATGTTGTTTCATCT
 TCGTCTCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGATGGAAAGTGTGTTTTCGTAAGCTTAAGAAGGTAGAGTCACGGAATTAATTAGCT
 TTTTACATTGCAAAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAATCACAAAAATAAATAGTTCGATATATTTGGCCAATTAGAATCACTTTAA
 TTTCAATAATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGCCTTTGATTAGCATGTTTTCTTCAATGAATGGACATTGAGGTTTTATTTGATTC
 TCACATGACCCGAGCTGTGCGGCCAACCTATGGAATTCAGATTTGTCCAGAAGAAATCAAAGTACATTTTTCCAGGCGATTAAATCTT
 TCCATTACTCAGACTTCAAAATAAATAAATGGAATAATTGAAGCACTATGATAAAATAATTCACATTAATCACTCTGACTTTACAGTC
 AAGATTGAACACTATTAAAAAGTGTGATAAAACAACATCTGTATGCATAATTTGTTAACTGTTAATAGTCTCTAATAATTGTTTTAT
 GGAAATGTATTAAATTACATTTAATATTATTTGCTTGAGTTTACCATCATGTGTTTTTGTTTGTTTTTACAGTTGGCAAGCATGT
 TGGCGGCTTGGCCCTTGAGTAAGGACTCTACCATCACTACTGTTAATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTAACACTT
 CTCTTGCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTATTAACCTTGGCGAGCAGCAGGAGCTTGACAGCGCGCAGTCGATGAG
 GACCCAGTGTCTATTGTCTTTGACTGGAAGAAGTCCGCTTGAAGGAG

11

ACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTTAGACGAGACCAACCGTTGGCGAAATGTGCTCAACTTGTTATTG
TATAATAACAAGTTTAAACGATCTTATTTTTTCGTTTTTTTGTAGAATGAAGTTCAGTCGCCACCTTCTCGATGTTGTTTCATCTTCGT
CCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGGATGGAAAAAATGGTTTTAAATAGGGCTAAGAAAGGTAGAGTACCGGAATTAATTAGCTTTTT
ACATTGCAAAATAGATTTTTTATACAGCTGGAATATCAAAAAATAATAGTCGATATATTGGCCAAATAGAATCACTTTAAATTT
AATAATCTAAATAACAACCTAAAGGCCTTTGATTAGCATGTTTCTTCATGAAATGGACATTGAGGTTTATTTTGATTTCCATCATG
CACCAGCCTGTGCGGCAACCAATGAATTCAGATTTGTCGCAGAAAGATTCAAAGTACATTTTTCCAGGCGATTAAATCTTTCATT
CTCAGATTTCAAAAATAAATAGAAATAATTGAAGCACTATGATAAAATATACACATTTCACTCTGATTTTACAGTCAAGATTG
AACACTATTA AAAAATCTGTGATAGAACATCATCTGTATGTGTAATGTTTAACTGTTAATAGTCCCTAAATAATGTTTATGGAAATG
TATTAATTTACATTTAATATTATTTGCTTGAGTTTACCATCATGTGGTTTTGTTTGTTTTTACACAGTTGGCAAGACTGTGGCGG
TGGGCCGTTGAGTAAGGACTTCTACCATCTGATCTGTAATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTAAC TACTTCTCTGT
TCTCGTGACTCTCTCCATCCGACTCCTCTGCAGCTATTACCTTTGGCAGAGCCGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAGGACC
CAGTGCTATTGTCTTTTGACTGAAGAAGTCGCTTGAAGGACGCTTCAGAA

//
NRC-13
TTGCCCACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTTAGACGAGACCAACCATTTGGGAAATGTGCTCAGCTTG
TTACTGTATAATGCAAAAGTTAAGTATCTTTATTTTCTGTTTTTTTGTAGAATGAAGTTCACGTCCAACTTCCTCATGTTGTTTC
ATCTTCGTCTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTGGTTGGCGAACATTCGCTTAAAAAGCTGGTCACGGAATTAATACGCTTTTTACA
TTGCAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAATGACAAAAATAAATAGTCGATATATTTGGCCAATTAGAATTTATTTGATTTCAAT
AATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGTCCTTTGATTAGCATGTTTCTCAATGAAATGGACATTGAGGTTTATTTTGATTCTCACATG
ACCGACCTGCTGCGGCAACAATTGAATTGAGATTTGTCCGAGAAGAAATCAAAGTAAATTTCCAGGGGATTAATCTTTCCATTAC
TCGGATTTAAAAAATAAATAAGATAAATGCAATTCGATGAAAAATAATACACATACTGTCTGATTTTACAAGTCAAGATTG
AACACTACTTTAAAGTATGTATAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTTAAACAAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGA
AATGTATTAATTGTCTAAATATAATTGCTTGAGTTTATCATCATGTTTTTTTTTTTTTTTACACAGAGGTTAAGACTGTTG
GCAAGTTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTATATTTTGTAGTATTATCACCAGTACTGTAGTACTGACAACTT
CTCTCTCCACCAACTCATCCGACAGATTACCTTTGGCAAGCAGCGGAGCTCGACAAGCGCGCAATTGATGACGACCCAGTATTA
TTGTTTTTGAAGTGAAGAGTCCCTTTGAAGGAGCCTTCAGAA
//
NRC-14
ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGAACCCGAGAGGCTGGTTGGGGAAGTATTTTCAA
CATATTTTCAAAGCTGGAAGTTTATCCATGGTGCATCCAGGCACACAATGACGGCGAGGAGCAGGATCTCGACAAGCGCGCAGTC
GATGA
//
NRC-15
ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTGGGGAAGCTTTTGAA
TTGGCATGCTGAAGTTCGGGCTGCTCCATCAGCATTGGGTGCTGACGAGCAGCAGGAGCTCGACGAGCGCTCAGAGGAGGACGAG
CCCAATGTTATGTTTTTGAATGAAGAAGTCGATTGAAGGAGCCTTCAG
//
NRC-16 和 NRC-17
ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGCTCCGT
AAAGGTAGAGTCATGGATTAAATTTGCTTTTTTACATTGCAAAATACCTTAAATATAACATAGTTGGAAAAACCAAAAAATAAGTAGTCG
ATATATTTGGCCATATAGAATCATTGATTCAATAATAATCAAAACAACATCAAAAAGCCATTGATTAGCATGTCCCTTCACT
AAAATGGACATTGTAATTTATTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAAATCAAATTTGCTCAGAGAAGATTC
AAAGTACATTGTTCTAGCGGATTTAATCTTTCCATTATCGGATCTGTTTTTAAAAAATAAGATAAATCTGATCTCTATGTTAAAAAT
AATAAAACACACATTCTGATTTTACCTGTCAAGATTGAACACGACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTT
AATCTCAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCTATTGTCTATATAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTG
TTTTGTTGTTTTTACACAGGTGCAAGCCTTTGGCCAGGCGCCATTAAAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTTA
ACAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACCTACTCTGTCTCTGTACTCTCTCAGGGGTTTTGGCCCTTTGCGAAGAGCAGCAG
GAGCTCGACAAGCGCTCAATGGATGACGAGCCAGTGTATTGTTTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTTCAG
//
NRC-18
ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGTTCACT
AAAGGTAGAGTCATGGATTAAATTTGCTTTTTTACATTGCAAAATACCTTAAATATAACATAGCTGGAAAAATCAAAAAATAAGTAGTCG
ATATATTTGGCCATATAGAATCATTGATTCAATAATAATCAAAACAACATCAAAAAGCCATTGATTAGCATGTCCCTTCACT
AAAATGGACATTGTAATTTATTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAAATCAAATTTGCTCAGAGAAGATTC
AAAGTACATTGTTCTAGCGGATTTAATCTTTCCATTATCGGATTTGTTTTTAAAAAATAAGATAAATCTGATCTCTATGTTAAAAAT
AATAAAACACATCTGATTTATCTGTCAAGATTGAACACGACTTAAAGTATGAATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAA
CTGTCAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCTATTGTCTATATAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTG
TTTTGTTGTTTTTACACAGGTGAAAGGTTATCCAGAGGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTATATTTTAAATAGTATTATCATC
AGTACTGTTATTGATAACTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCAGGCATTTCGCTGACGTGACGAGCAGGAGCTCGACAAGCG
CTCAGTGGATGACGAGCCAGTTCTATTGCTTTTGACTGAAGAAGTCGCCTTGAAGGAGCCTTCAG
//
NRC-19
TTATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGAGCCTGGAGAGTGTTTTTTGGGATTGCTTTTTTC
ACGGGGTCCACCATGGTAGGTCACGGAAGTAATTGATTTTTTACATGGCAAATATTTTAAAGATAACACCATATGAGTAGTCGAT
ATATTTGACCAATTAGAATCATTAAATTTCAATAATAATCAAAATAACAATCTTAGGCCATTAAATCTTTCCATTAAATCGGATTT
GTTTTTTTAAATATAGAATAAAGTGGATCTCTATGTTAAATAATAAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGTACGCTACT
TAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTGTTAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTAA
ATTGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGTTGGAAAGTGGATCCATGGGTAAGG
ACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGATAATTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCA
TCAGACTCATCATGGGATCAGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAA
//
NRC-20
TTATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTATGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTGGGAATTCTTTTTC
ACGGGGTCCACCATGGTAGAGTCACGGAATTAATTGATTTTTTACATGGCAAATATTTTAAAGATAACACCATATGAGTAGTCGAT
ATATTTGACCAATTAGAATCATTAAATTTCAATAATAATCAAAATAACAATCTTAGGCCATTAAATCTTTCCATTAAATCGGATTT
GTTTTTTTAAATATAGAATAAAGTGGATCTCTATGTTAAATAATAAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGTACGCTACT
TAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTGTGTTAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTAA
TTGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGAGTTTTTGTGTTTTTACACAGGTAGAAAGAGGCCTTGCAAGTAAGG
ACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGATAATTTCTCTGTCTCGCTGACTCTCTCCA
TCAGGATGAACCTCAGAGCGTCGAGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAA
//
NRC-101
GCCCACTTTGTATTTCGCAAGGTAAGATCGATATTTTTCAAATTCATTTAGACGAGACCAAGCATTGTTGAAATGTGATAAGCTTCT
AACTATAAATGCAAAATGTAACAATCTTTTTGTTCTGTTGTTTTTGTAGGATGAAGTTGGCTGCCGCTTCTGGTGCTGTTCTCTG
GTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTCTGGGATTTCTTTTTTACGGTATCCACCATGGTAAAGTCACTCATTTAATACAT
TTTTACATGGCAAATATTGAATATAACATACTATATAGTTGTCAATATATGTGGCCAGTAGAAGCACTTTGATTTCAATAATAA
TCAAAATGACCAATCACTAAGCCATTAAATAATTGAATTAATACATTTGTTTTAAAAAATAAGATAAATCTGGATCTTTATGCTAA
AATAATTAACCTAAATCAGATTTTACCCTCAAGATTGAACACTACTTAAAGTATGTAAGGATGTAAGGATCATCTGTATGTATAAT
TAAATACTAGTCCAGTTAATTGTTTTATGGAATGTGTTAATTGACATATATCATTGCTTGAACCTATAATGTGCTTTGTTGTTTT

11

11

//

11

11

11

11

11

72

AGACTCATCCATGGCGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGAA

//

NRC-110

GCCCACTTTGTATTGCAAGGTAAGAGCGATATATTTCAAATTCATTGCGATGAGACCAAGCATTGGGAAATGTGCTCAGCTTGTT
ACTGTTTAATGCAAATGTTAACAATATCCTTTTCTGTTGTTTTGTAGAATGAAGTTCGCTGCCGCCCTTCTCATGATGTTTCATGG
TCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGCTCGTTGGGGAACGTTCTTCAAACATATTTCAAAGGTAGAGTCACAGAATTAATTTGCT
TTTACATTGCAAAATATTTTATATAACATAGCTGGAAAAATCACAAAAATAGGGCTTGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCCTTTG
ATTTCAATAATAATCAAAATAAAATCAGAAAGGCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATAAAATGGACATTGTAGTTTATTTTGATT
CTCAAATGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAAATCAAATTTGTCTCCGAAACATTTAAAGTACATTTTCGAGGCAATTTAATC
TTTCCTTTGATCGAATTCGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTTTATGCTAAAAATAATAATCATACATTTCTGATTTTACCAG
TCAAGATTGAACGCTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCCTAATAATTG
TGTTATGGAATGTATTCAATTGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTTGTGTTGTTTACACAGCTGGAAG
GTTTCATCCATGGGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTG
TCTCGCTGACTCTCTCCATCAGTCGATCCAGGCACACAAATGACGCGAGCAGGATCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGATGAGC
CCAGTGTTATTGTTTTTGAATGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-111

GCCCACTTTGTATTGCAAGGTAAGAGCAATATATTTCAAATTCATTAGACGAGACCAAGCATTGGGATCTGTGCTCAACTTGTA
ACTGTATAATGCAAATGTTAACAATATCTTTTCTGTTGTTTTGTAGAATGAAGTTCGCTGCCGCCCTTCTCATGATGTTTCATGG
TCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGGTGCTTGGATCGCTGCCCTTGAATAGGATCTATCATGGTAGAGTCACAGAGTTAATTTGCT
TTTACATTGCAAAATATTTAATATAACATGGCTGGAAAAATCACAAAAATGAGTACTCGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCCTTTG
ATTTCAATAATAATCAAAAACACAATCAAAAAGGCCATTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGACATTGTAGTTTATTTTGATT
CTGACATGCACCAACTTGCTGCGGCAACAATTGAATTCAAATTTGTCTCAGAAAAATTTAAAGTACATTTTCTTCTTCCATTAGTCGG
ATTTGTTTTTAAAAAATACAGAATAACTGGATCTTTATGCTAAAAATAATAATCATACATCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACGC
TACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATTGATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCCTAATAATTGTGTTATGGAATGT
ATTCATTGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTGTTTTTACACAGCTCTACTGAGGATCAATCGGT
AAGGACTTCTACCATCTACTGTGTAATTTAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTTGTGCTGCTCTC
TCCATCAGCCAAATGGTGATTATCGTCGGCACTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGCTCTCGACAAGCGCTCAGTGGAGGACCAG
CCAGTTCTATTGCTTCTGCTGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-112

GCCCACTTTGTATTGCAAGGTAAGAGCAATATATTTCAAATTCATTAGACGAGACCAAGCATTGGGATCTGTGCTCAACTTGTA
ACTGTATAATGCAAATGTTAACAATATCTTCTTCTGTTGTTTTGTAGAATGAAGTTCGCTGCCGCCCTTCTCATGATGTTTCATGG
TCGTCCTCATGGCTGAACCCGGAGAGGGTGCTTGGATCGCTGCCCTTGAATAGGATCTATCATGGTAGAGTCACAGAGTTAATTTGCT
TTTTACATTGCAAAATATTTAATATAACATGGCTGGAAAAATCACAAAAATGAGTACTCGATATATTTGGCAAAGTAGAATCCCTTTG
ATTTCAATAATAATCAAAAACACAATCAAAAAGGCCATTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGACATTGTAGTTTATTTTGATT
CTGACATGCACCAACTTGCTGCGGCAACAATTGAATTCAAATTTGTCTCAGAAAAATTTAAAGTACATTTTCTTCTTCCATTAAATCGG
ATTTGTTTTTAAAAAATACAGAATAACTGGATCTTTATGCTAAAAATAATAATCATACATCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACGC
TACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATTGATAATTGTTTAACTTTTAACTAATAGTCCTAATAATTGTGTTATGGAATGT
ATTCATTGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTGTTTTTACACAGCTCTACTGAGGATCAATCGGT
AAGGACTTCTACCATCTACTGTGTAATTTAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTTGTGCTGCTCTC
TCCATCAGCCAAATGGTGATTATCGTAGGCACTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGCTCTCGACAAGCGCTCAGTGGAGGACCAG
CCAGTTCTATTGCTTCTGCTGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-113

ATGAAGTTCAGTCCACCTTCTGCTGTTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGTTCCT
AAAGGTGCCAAGCACCTTGGCCAGGCGCCATTAAACGGTTTGGCTCTTGCAGAGAGCAGCAAGAGCTCGACAAGCGCTCAGAGGAT
GACGAGCCAGTGCTATTGTTTTTGAA

//

NRC-114

ATGAAGTTCAGTCCACCTTCTGCTGTTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGGATCCGGAGAGTGTGGTTGGAAAAAGTGGCTCCGT
AAAGGTAGAGTCATGGATTAAATTTGCTTTTACATTGCAAAATCTTTAATATAACATAGTTGGAAAAATCACAAAAATAGTAGTCG
ATATATTTGGCCATATAGAATCATTGATTCAATAATAATCAAAAACACAATCAAAAAGCCCATTTGATTAGCATGTTCTTCTCCT
AAAATGGACATTGTCAATTTATTTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGAAATCAAATTTGTCTCAGAAGAATTC
AAAGTACATTTGTTCTAGGCGATTAAATCTTCCATTTCATCGGATTGTTTTTAAAAATATAGAATAACTGGATCTCTATGTTAAAT
AATAAAACACACATTCTGATTTTACCTGTCAAGATTGAACACGACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATTGTTT
AACTGTCAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCAATTGTCATATAATATCATTGCTTGAATTTATCACCATGTG
TTTTGTTTTGTTTTTACACAGGTGCCAAGCACCTTGGCCAGGCGGCCATTAAAGTAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTA
ACAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACTACTTGTCTCTGTGACTCTCTCAGGGGTTTTGGCCTCTTGCAGAGAGCAGCAG
GAGCTCGACAAGCGCTCAATGGATGACGAGCCAGTGCTATTGTTTTTGAAGTGAAGAAGTCGCTTGAAGAGCCTTCAG

//

NRC-115

GCCCACTTTGTATTGCAAGGTAAGAGCGATATATTTCAAATTCATATAGACGAGACCAAGCATTGGGAAATGTGCTCAGCTTGTT
ACTGTATAATGCAAATGTTAACAATGTTTTGTTCTGTTGTTTTGTCAGAATGAAGCTCGCTGCTGCCCTTCTGGTGTGTTTCATGG
TCGTCCTCATGGCTGAACATGGAGAGGGTTTTGGGGATTTCTATATGAAGCCTGGTAGAGTCACGGAATTAATTCGATTTTAAACATG
GCAAAATTTTACTATAACATACCATATGAGTAGTCGATTAATTAATTGGATTGTTTTTAAAAATATAGAATAATTGGATCTTTAT
GCTAAAAATAATTAACATACATTCTGATTTTACCAGTTAAGATTGAACGCTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTACATAT
AATGTTTTAACTGTTAAACCAATAGTCCAAATAATTGTGTTGTTGGAATGTATTAAATGTCATTTAATATCATTGCTTGAATTTGTC
ACCATGTGTTGTTGTTTTGTTTTTACACAGGTAGAAAGATTCCCATGGGTAAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTGACAG
TATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTGCTGACTCTCTCAGGTACATCAGAGTCCTTATGTTTACGACGAGC
AGCAGGAGGTCGACAAGCGCTCAGTCGATGACAACCCAGTGCCATTGCTTCTGACTGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-116

ATGAAGTTCAGTCCACCTTCTGCTGTTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGCGAGGGTTATTGGCGCTTCCGCAACCAC
CGTGGTGAAGGTTATCCAGAGGCATTTGCTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGACGAGCCAGTTCT
ATTGCTTTTGA

//

NRC-117

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCGTGTGTTTCATCGTTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTGTTTTGGAATGCTTTTCCACGGGTC
CCATGGTCGGGTCACGGAAGTAGTTTCGATTTTACATGGCAAATATTTAAATGAAACATACCATATGAGTAGTCGATATATTTGGCC
AAGTAGAATCACTTTGACTTCAATAATAATCAAAAACATAATCAAAAAGCCATTGATTAGCATGTTCCCTCAATGAAATGGACATT
GAGGTTTATTTTGATTCTCACAGGCACCAACCTGCTGCGGCAACAATTGCATTCAAATTTGTCCTCAAGAACTAATTAACATTTT
CTGGCGATTTAATCTTTGCATAAATTGGATTGTTTTTAAAAATATAGAATACTGGATCTTTATGCTCAAATAATTAATCATACAT
TCTTATTTTATCAGTCAAGATTGAACGCTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAATGTTTTAACTTTTAACTAAA
AGTCTAATAATTTGTTATGGAATGTATTAAATTGTCATTTAATATCATTTCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGGTTT
TTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTAAGGACTTCTACCATCATTAAGTATAATGTTAATAATAGCATTATCATCAGTACTGT
TATTGATAACTTCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCCATCAGATTCAACACGTCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGC
GCTCAGTGGATGACGAGCCAGTTCTATTGCTTTTGCCTGAAGAAGTCGCTTG

//

NRC-118

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTTGGATTGATTGCGACT
GCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTTCGATTTTACGTGGCAAATATTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATATA
TTTGACCAAGTAGAATCACTTTGACTTCAATAATAATCAAAAACATAATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATTGTT
TTTTAAAAATATAGAATACTGGATCTTAATGCTAAAATAATTAACATACATTCTGATATTAACAGTCAAGATTGAACGCTACTTAA
AAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTTAACTGTGCGACTAATAGTCTTAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCAAT
GTCATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTAAGGACT
TCTACCATCATTACTGTATAAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCCATCA
GACTACTCGGCTTTTCATCATGGGCTTCCCGGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGAGG
AGCCAGTTCATTGCTTTTGAATGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCTTCAG

//

NRC-119

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTTGGATTGATTGCGACT
GCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTTCGATTTTACTTGGCAAATATTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATATA
TTTGACCAAGTAGAATCACTTTGATTCAATAATAATCAAAAACATAATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATTGTT
TTTTAAAAATATAGAATACTGGATCTTAATGCTAAAATAATTAACATACATTCTGATATTAACAGTCAAGATTGAACGCTACTTAA
AAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTTAACTGTGCGACTAATAGTCTTAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCAAT
GTCATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTAAGGACT
TCTACCATCATTACTGTATAAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCCATCA
GACTACTCGGCTTTTCATCATGGGCTTCCCGGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGAGG
AGCCAGTTCATTGCTTTTGAATGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCTTCAG

//

NRC-120

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCCTCATGGCTGAACCTGGAGACTGTATTTTTGGATTGATTGCGACT
GCGGTCCACAATGGTAAGTCAAGGAATTAATTTCGATTTTACTTGGCAAATATTTAGTATAACATACCTTATGAGTAGTCGATATA
TTTGACCAAGTAGAATCACTTTGTTTCAATAATAATCAAAAACATAATCTCTAGGCAATTTAATATTGCAATTAATTGGATTGTT
TTTTAAAAATATAGAATACTGGATCTTAATGCTAAAATAATTAACATACATTCTGATATTAACAGTCAAGATTGAACGCTACTTAA
AAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTTAACTGTGCGACTAATAGTCTTAATAATTGTGTTATGGAATGTATTCAAT
GTCATATAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGCTGGAAGGTTGATCCATAGGTAAGGACT
TCTACCATCATTACTGTATAAATTTAAGAGCATTATCATCAGTACTGTTATTGATAACTTCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCCATCA
GACTACTCGGCTTTTCATCATGGGCTTCCCGGGTTCTGGCACGGTGACGTCGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCTCAGTGGATGAGG
AGCCAGTTCATTGCTTTTGAATGAAGAAGTCGCTTGAAGGAGCTTCAG

//

NRC-121

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCGTGTGTTTCATGGTCATCGTTCATGTTTGAACCTGGAGAGTGTGTTTTTGGAAATGCGTTTTTCC
GGGTCCACCATGGTAGGTCACAAAAGTAGTTGATTATTACATGGCAAATATGTTAATGAAACATACCATATGAGCAGTCGTATT
ATTTGGACAAGTAGAATCACTTTGATTCAATAGTAATTAATAAACAATCAAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCCCTCAATGAA
TGGACATTGAGGTTTATTTGATTCTCACCTGCATCGACCTGCTGCGGCAACTATTGAAATCAAATTTGTCCCAAGAACTAAAT
TAACATTTCTAGGCCATCTAATCTTTGCATGAATGGATTGCTTTCAAAAATATAGAATACTGGATATTATGCTAAAATAATA
AAAACACACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTACTTAAAGACGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTGAC
TTTTAACAAATAGTCAAATGATTGTTATGGAATGCATTAAATTGTCAATTAATCATTTACTTGAATTTATCACCATGTGTTTGT
TTGTTTTTTAGCAGGTGGAGGTTTTCTCAATGCGCAAGGACTTCTACCATCATTACTGTGTAATTTAATAGTATATCATCAGTAC
TCTATTGACAACGTCTCTTGTCTCGTGAATCTCTCTATCAGATTAAACCCAGGGTATCGCGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCG
ACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-122

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGGTGTGTTCTTGGTGTGCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTCTTTGGAGCCCTTCTCAAA
GGTAGAGTCACGGAATTAATTTGATTGTTACATGGCAAATAATTTGTATAACATATCATATGAGCAGTCGATGATTTTGACCAAGA
AGAATCATTTTGATTTCATAATAATCAAAAACATAATCTCTGGAGATTATATATTGCAATAATTGGATTTTTAAAAATATAGAA
CAACTGGATCTTAATGCTAAAATAATTAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAAATTAACCACTCTTTAAAGTATGTATAAAAC
ATCATCTGTATGTTTAAATTGTTTAACTTTTAAACAAATAGTCCAAATAATTGTGTAATGGAATGTATTCAATGTCATATAATATAGT
TTGCTTGACTTATCACCAGTGTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGGTGCCAGGCGCTCCATGGGTAAGGACTTCTACCATCATGACT
GTGTAAGTTTAAATAATATATCATCAGTACTGTTATTAACGACTTCTTGTCTCGTGAATCTCTCTCATCAGAAATCATCCAAATG
CTCGTCACGGTTACGACGAGCAGCAGGAATCAACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-123

GCCCACTTTGTATTGCGAAGGTAAGATCAATATTTTTCAAATTCATTAGACGAGACCAACCGTTTGGAAATGTGCTCAGCTTGT
ATTGTATAATAACAAAGTTAAGATCTTTATTTTCTGTTTTTTGTAGAATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTGATGTTGTTTCATCT
TCGTCCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGTTTGGAAAGATTGGTTTCGTAAGGCTAAGAAAGGTAGAATCACGGAATTAATTAGCT
TTTTACATTGCAATAGATTTTTTATAACAGCTGGAAATCAAAAATAAATAGTGCATATATTGGCAATTAAGATCACTTTAAT
TTCAATAATAATCTAAATAACAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAGGACATTGAGGTTTATTTGATTCT
CACATGCACCGACCTGTGCGGCAACAATTGAATTCAGATTGTCCAGAAGAAATCAAAATACATTTTCCAGGCGATTAAATCTTT
CCATTACTCGGATTTAAAAATAAATAAATAAGAACTGAAGCGCTATGATAAAATAATTACACATTCACTTCTGATTTTCAAGTCA
AGATTGAACACTATTAAAGGTGTGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTAACTGTTAATAGTCTTAATGTTGTTATG
GAAATGTATTAATTTACATTTAATATCATTTGCTTGAGTTTACCATCATGTGTTTTTGTGTTTTTACACAGTTGGCAAGACTGTT

GGCGGCTTGGCCCTTAAGTAAGAACTTCTACCATCATTACTGTATAATTTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTAACACTTCTC
TCTTGTCTCGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCCGAGTCATTACCTTGGCGAGCAGCAGGAGCTTGCCAAGCGCGCAGTCGATGA
CGACCCAGTGTTATTGTCTTTGACTGAAGAACTGCGCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-124

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATTTTAATCTTCGTCTCATGGTCGAACCTGGAGAGTGTGGTATTAGGAAATGGTTTAA
AAGGCTGCTCACGGTAAAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTCGCTTTACAAATATTTTATATAGCAGCTGGAAATCAAAAAATA
ATAGTCGATGATTTTGGCCAATTAGAATCACTTTGATTTCAAATAATAATCTAAATAGCAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTT
CCTTCAATGAAATGGATGTTGAGGTTTATTTGATTTCTCACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAATTTGAATTTCAATTTGTCCAA
AGGAATTCAAAGTAACTTTCTAGATGATTTAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTTAAAAATATACATTAATACTCAATCATAT
GATAAAATAAACAACATACATTCTGATTTATACAAGACAAGATTGAAAACCTTTTAAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTTTGT
TAATTTGTTTATCATTTTCAAAAAAGTCCAACTAATTTGTGTTATGGAATTTGATAAAATTTGTATTAAATATAATTTTGTGAGTTTAT
CAATATGTTTGTGTTTGTGTTTACACAGTTGGCAAGGAAGTTGGCAAGGTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATATTACTGT
TAATTTTGTATGATTTATCACCGTACTGTTATTGACCAACTTCTCTTTTCTGCTGACTCTCTCCATCTGACTCATCTGCAGTGCTT
GCCTTGACAAGCAGCAGCAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-125

GCCCACTTTGTATTTCGAAGGTAATATCGATATTTTCAAACCTCATTTAGACGAGACCAAGCATTGGGAAATGTGCTAAGGTTGTT
ACTGTATATGCAAAATTAATGATCTTTATTTTCTGTTTTTTTGCAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATTTTAAATC
TTCTGCTCATGGTCGAACCTGGAGAGTGTGGTTTGAAGAAATGGTTTAAAAAGGCTGTTACGGTAGAGTCACGGAATTAATTTGC
TTTTGCTTTTACAAATATTTTATAGCAGCTGGAAATCACAAAAATAAATAGTCGATGTTATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGA
TTCAATAATAATCTAAATAGCAACCTAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGATGTTGAGGTTTATTTGATTC
TCACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAATTTGAATTTCAATTTGTCTCCAAAGGAATTCAAAGTAACTTTCTAGGCGGATTAATCT
TCCATAACTCTCGGCTTTGTTTTTAAAAATATATAAATCAATCCCTATGATATAAAATAAACAACATACATTTGATTATACAG
ACAAGATTGAAAACCTTCTTGAAGTATGTATCAACATCATCTGTTTGTATAATTTGTTTAAACAGTTTCAAAAAAGTCCAACTAATTTG
TGTATGGAATTTGTATAAATTTGTCATTTAATATAATTTTGTGAGTTTATCAATATGTTTGTGTTTGTGTTTACACAGTTGGCAAG
AAGTTTGAAGGTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATATTACTGTGTAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGAC
AACTTCTCTTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTGCTTTACCTTGGCGAGCAGCAGCTCGACAAGCGTGCACT
CGATGAAGAGCCAGTGTTATTGCTTTTGAAGTGAAGAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-126

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATGTTTATCTTCGTCTCATGGTTGAACCTGGAGAGTGTGGTTGGAGGAAATGGATTAA
AAGGCTACTCACGGTAAAGTCACGGAATTAATTCGTTTTTTCGCTTTTGCAGAAATATTTTATATACAGCTGGAAATGTCACAAAAATA
AATAGTCAATATATTTGGCCAATTAGAATCACTTTGAGTTCAATAATAATCTAAATAACAACCAAAAGGCCCTTCTCTTAATGAAA
TGACGTTGAAGTTTATTTGAATCTCACATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAATTTGAATTTCAATTTCTCCAGAGGAATTCAAAG
TAAATTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATTAATCTGATTTGTTTTTAAATATATAGAATGACTCAATTTGCTATGATATAAATAATA
GCCATACATTTCTGATTTTACAAGACAAGATTGAAAACCTTCTTAAAGTACGTATAAAACATCATCTGATTTATAATTTGTTTAA
TTTAAACAAATTTGCTTACTAATTTGTGTTTGAAGAAATGATAAATTTGTCATTTAATATCATTGCTTGTGAGTTTATCATTTATTGTTT
TGTGTTGTTTTTACACAGTTGGCAAGCATATTGGCAAGCGGCCCTTGAGTAAGAACTTCTACCATATTACTGTATAATTTGATAG
TATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACTTCTCTTGTCTGATGACTCTGTTTATCCAACTCATCTGCAGTGCTTACATTGGCGGGA
AGCAAGAACTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-127

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATGATTTTAATCTTCGTCTCATGGTCGAACCTGGAGAGTGTGGTTGTAAGAAATG
GTTTAAAAAGGCTGCTCACGGTAGAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTTTCGCTTTTACAAATATTTTATATAGCAGCTGGAA
AATCACAAAAATAAATAGTCGATGATTTGGCCAATTAGAATCACTTTTCAATTTCAATAATAATCTAAATAGCAACCTAAA
AGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGATGTTGAGGTTTATTTTGAATTTCTCATGTCACCGGACCTGCTGCGG
CAACAATTTGAATTTCCAATTTGTTCCAAAGGAATTCAAAGTAAACTTTTCTAGGCGATTAAATCTTTCCATAACTCGGCTT
TGTTTTTAAAAATATATAAATCAATCCCTATGATAAAATAAACAACATACATTCTGATTTTATACAAGACAAGATTG
AAAACCTTCTTGAAGTATGTATCAACATCATCTGTTTGTATAATTTGTTTAACTTTTCAAAAAAGTCCAACTAATTTGT
TTATGGAATTTGTATAAATTTGTCATTTAATAATTTTGTGAGTTTATCAATATGTTTGTGTTTGTGTTTACACAGTTG
GCAAGAACTTTGGCAAGGTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATATTACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGT
ACTGTTATTGACAACCTTCTCTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTGCTTACCTTGGTGAGCAGCAGC
AGCTCGACAAGCGTGCACTGATGAAGAGCCAGTGTTATTGCTTTTGAAGTGAAGAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-128

GCCCACTTTGTATTTCGAAGGTAATATCGATATTTTCAAACCTCATTTAGACGAGACCAAGCATTGGGAAACGTGCTAA
GGTTGTTTACTGTATAATGCAAAATTAATGATCTTTATTTTCTGTTTTTTTGCAGAAATGAAGTTCACTGCCACCTTCC
TCATGATTTTAAATCTTCGTCTCATGGTCGAACCTGGAGAGTGTGGTATTAGGAAATGGTTTAAAAAGGCTGCTCACGGT
AAAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTGCTTTTACAAATATTTTATATAGCAGCTGGAAATCAAAAAATAAATAGTCG
ATGATTTTGGCCAATTAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCTAAATAGCAACCTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTT
CTTCAATGAAATGGATGTTGAGGTTTATTTTGAATTTCAATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAATTTGAATTTCAAAATTTG
TCCCAAGGAATTCAAAGTAACTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTTAAAAATATATAAT
AACTCAATCCCTATGATAAAATAAACAACATACATTCTGATTTTATACAAGACAAGATTGAAAACCTTCTTGAAGTATGT
ATCAACATCATCTGTTGTATAATTTGTTTAACTTTTCAAAAAAGTCCAACTAGTTGTGTTATGGAATTTGTATAAATTTG
TCATTTAATAATAATTTTGTGAGTTTATCAATATGTTTGTGTTTGTGTTTACACAGTTGGCAAGAAAGTTGGCAAGGTG
GCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATATTACTGTATAATTTGATAGTATTATCACCAGTACTGTTATTGACAACCTTCTC
TTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTGCTTACCTTGGCGAGCAGCAGCTCGACAAGCGTGCACTG
GATGAAGAGCCAGTGTTATTGCTTTTGAAGTGAAGAGTGCCTTGAAGGAGCCTTCAG

//

NRC-129

AATGAAGTTCACTGCCACCTTCCTCATAGATGGTTTATCTTCGTCTCAATGGGTTGAACCTGAAGAGTGTGGTTGG
AAAGAAAGTGGTTTAAAAAGGCTACTCACGGTAAAGTCACGGAATTAATTTAGCATTTTCTTTGCAAAATATTTTAT
ACAGCTCGAAATTCACAAAAATAAATAGTCGATATTTTGGCCAATTAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCTAAAT
AACAACTAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAAATGGACGTTGAGGTTTATATTGATTTCTCATGTCACCG
ACCTGCTGCGCTCAACAATTTGAATTTCAAAATTTGAGAGGAATTCAGCGTAAATTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCAT
TCGGATTTGTTTTTAAATATATAGAATAAATCAATTTGCTATGATAAAATAAACAACATACATTGATTTTACAAGAC

AAGATTGAAAACCTTCTTAAAGGTACGTATAAAACATCATCTGTATTTATAAATTGTTTAAACATTTAACAATAATCCTACT
AATTGTGTTATGGAAATGTATAAATTGTAATTTAATATAAATTGCTTTAGTTTTATCATTATTGTTTTGTTTTGTTTTTA
CACAGTTGGCAAGCATGTTGGCAAGCGGCCCTTGAGTAAGAACTTCTACCATCATTACTGTATAAATTTGATAGTGTTA
TCACCAGTACTGTATTGACAACTTCTCTGTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCCGAGTGCTTACCTCGGCGA
GAAGCAAGAACTCGACAAGCGCGCAGTCGATG

//

NRC-130

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTTTCGGATTGCTTTTTTCAC
GGGATCCACCATGGTAGGGTCACGGAATTAATTAGATGTTTTACATGGCAAATATTTAAGATAACACACCATATGAGTAGTCGATAT
ATTTGACCAATTAGAATCACTTTAATTTCAATAATAATCACAATAACAATCTCTAGGCCATTTAATCTTTCCATTAAATCGGATTTGT
TTTTTTAAATATAGAATAAATGAGATCTTTATGCTAAAATAATGAAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACGTTACTTA
AAAGTATGTTTTAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTAGCTGTAACAAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAAATGTATTAAT
TGTATATAATATAATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTGTTTTTTAAACACAGCTGGAAAGTTGATCCATGGGTAAGG
ACTTCTACCATCATTACTGTGTATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTAAACAACCTCTCTCTATCGCTGACTCTCTCCA
TCAGACTCATCCATCATGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-131

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGGGTTTTTGGAAATTGGATGGGGCCC
CATATCAGCGGTAGAGTCACGGAATTAATTTGCTTTTTTCATTGCAAATATTTTAAATTTGCATAGCTGGAAATCAGGAAATAAGT
AGTCGATATATTTGGCCAAATAGAATAAATTTGATTTCAATAATAATCAAAATTAACAATCAAAAAGGCCCTTTGATTAGCATGTTCTT
TCAATAAAATGGACATTTGAAGTTTATTTGATGCTCATATGCCGACCTGCTGCGCAACAATTGAAATCAAATTTGTCTCAGAAT
TTAAAGTACATTTTCTAGGTGATTTAATCTTTCCATTCTGATTTATTTTATAAATATAGAATAAATGATCTTTCTGCTAAAA
TAATAAAACACACATTTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTACTTAAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTT
TAAGTGTAAACAATAGTCCAAATAATTGTGTTAAGGAAATGTATTAATTGTCTTTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGAG
TTTTTTGTTTTGTTTTTACACAGGTAGAAAGAAGGCCCTTGCACTAAGGACTTCTACCATCATTACTTTGTAATTTTATAGTATTATC
ATCAGTACTGTTATTGACAACCTCTCTGTCTCGTACTCTCTCCATCAGGATGAACCTCAGAGCGTCGAGTTACGACGAGTAGCA
GCAAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-132

ATGAAGTTCACTGCCACCTTCTGGTGTGTTTCATGGTCGTCTCATGGCTGAACCTGGAGAGTGTTTTTTGGGATTGCTTTTTTCAC
GGGGTCCACCATGGTAGGGTCACGGAAGTAATTCGATTTTTACATGGCAAATATTTAAGATAACACACCATATGAGTAGTCGATAT
ATTTGATATATTAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCAAAATAACAATCTCTAGGCGATTTAATATTTGCATTAAATGGATTGTT
TTTTTAAATATAGAATAAATGAGTCTTTATGTTAAATAATTAACATACATTCTGATTTTACCAGTCAAGATTGAACACTACTTA
GAAGTATGTATAAAACATCATCTGTATGTATAAATTGTTTAACTGTTAACTAATAGTCCAAATAATTGTGTTATGGAAATGTATTAAT
TGTCAATTAATATCATTTGCTTGAATTTATCACCATGTGTTTTGTTTTGTTTTTACACAGTTGGAAATTTGATCCATGGGTAAGGAC
TTCTACCATCATTACTGTGTATTTTAAATAGTATTATCATCAGTACTGTTATTGACAACCTCTCTGTCTCGTACTCTCTCCATC
AGACTCATCCATCAGGTTACGACGAGCAGCAGGAGCTCGACAAGCGCGCAGTCGATGA

//

NRC-133

GCCCACTTTGTATTGCAAGGTAATATCGATATTTTTCAAACCTATTTAGACGAGACCAGGCATTTGGGAAACGTGCTAAGGTTGTACT
ATGCAAAATTAATGATCTTTATTTTTCTGTTTTTTTTTGCAATGAAGTTCACTGCCACCTTCTCATGATTTTAACTCTCGTCTCAT
AACCTGGAGAGTGTGGTATTAGGAAATGGTTTAAAAAGGCTGCTCACGGTAAAGTCAAGGAAATTAATTTGCTTTTTGCTTTTACAAATATT
ACAGCAGCTGGAAATCAAAAAATAAATAGTCGATGATTTGGCCAAATAGAATCACTTTGATTTCAATAATAATCTAAATAGCAACCT
GCCTTTGATTAGCATGTTCTTCAATGAATGGGTGTTGAGGTTTATTTTGATTCTCATATGCACCGACCTGCTGCGGCAACAATGAAT
TTTGTCCCAAGGAATTCAAAGTAAACTTTCTAGGCGATTTAATCTTTCCATAACTCGGCTTTGTTTTTAAAAATATATAAATACTCAA
ATGATAAAATAATAACATACATTCTGATTTATACAAGACAAGATTGAAAACTTCTTGAAGTATGTATCAAACATCATCTGTTTATAT
TTTAACTTTTCAAAAAAGTCCAACTAATTTGTGTTATGGAATTTGATAAATTTGTCATTTAATATAATTTTTTTGAGTTTATCAATATGT
GTTTGTTTTACACAGTTGGCAAGAAAGTTGGCAAGGTGGCCCTTAAGTAAGGACTTCTACCATTTACTGTATAAATTTGATAGTATTA
AGTACTGTTATTGACAACCTTCTTTTTCTGCTGACTCTCTCCATCCGACTCATCTGCAGTGCTTACCTTGGCGAGCAGCAGCAGCTCGA
GTGCAGTCGATGAAGAGCCAGTGTATTGCTTTTGACTGAAGGAGTCGCTTGAAGGAGCCTTC

//

附件 II. 参照表 11 的 hepcidin 样基因和 cDNA 的核苷酸序列

NRC201

CGCCCTTAAGATGAAGACATTTCAGTGTTCAGTTGCAGTGGTGGTCGTCCTCGCATGTATGTTTCATCCTTGAAAGCACCGCTGTTCC
TTTCTCCGAGGTGCGAACCGGAGGAGTTGAAAGCATTGACAGTCCAGTTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCACGTCCATGAATCT
GCCGGTACGTTCAATTTAGTGAATGAATTAAGTAATTAACCTTAGCAAATTAACATCTAAGTGGTTGCGTTTCACCCCTTGGAAATTGA
ATTAGCCCACTAGCGCTAGTTGTTAACCATTGATTGTGAGCCGGTAGAGAGGGCTTCAGGGCGAGTAGTGTGAATACTTGTGAAGT
GGAGACTTGGACAAAAATACTTACCATGTGCTTGTCCCACCTTTTTTCATTTTCTTTCTTGGCTGAGATACAGATGCATTTCAGGT
TCAAGCGTCAGAGCCACCTCTCCCTGTGCCGTTGGTGCTGCAACTGCTGTCAACAAGGGCTGTGGCTTCTGCTGCAAAATTCGAG
GACCTGCCAGCAAAGGGCGAATTGTTTAAACAC

//

NRC202

AGATGAAGACATTTCAGTGTTCAGTTGCAGTGGTGGTCGTCCTCGCATGTATGTTTCATCCTTGAAAGCACCGCTGTTCTTTCTCCG
AGGTGCGAACCGGAGGAGTTGAAAGCATTGACAGTCCAGTTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCACGTCCATGAATCTGCCGATGC
ATTTTCAGGTTCAAGCGTCAGAGCCACCTCTCCCTGTGCCGTTGGTGCTGCAACTGCTGTCAACAAGGGCTGTGGCTTCTGCTGCA
AATTCTGAGGACCTGCCAGCA

//

NRC203

ACGAGGTCCCTCATCCGCTGACACCAAAAGAACAATCAATCAACTTTGGACTCGTCTTAGTGCAATTGAAATTTGTGCGTT
CGAGAGCGTCGCTTTTGGGGAACATTGAAGAGTTCTGATCTTCTCATAAACTGTCACTTCAATTTCAACTGATTTC AAC
AGGACTTTTAAATAGGCTATAAACTTCTTAAAAAAAACGAGAATGAAGGCCCTTTAGTGTTCAGTGGTACTCGTCAATTGC
ATGTATGTTTCATCCTTGAAAGCACCGCTGTTCTTTCTCCGAGGTGCGAACCGGAGGAGTTGGAAGCTTTGACAGTCCAG
TTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCAGTCCATGCATCTGCCGAGGCCCTTCAGGTTCAAGCGTCAGATCCACCTCTCC
CTGTGCCGTTTGTGCTGCAACTGCTGTCAACAATTGGCTGTGGCTTCTGCTGCAAAATTTCTAAGGACCTGCCCGCAACAT
TTTCTAGTTTGTATAGTTTGAATGTTTCTTTCTGAGATGTTGTTTGTGACTATGATAATGATTATATAAAATCACT
TCTTATTGTGACACTTAAAAAAAATAAACACATCTTTGAATACAAAAAATAAAAAA

//

NRC204

CGAACGGAGGAGGTTGAAAGCATTGACAGTCCAGTTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCACGTCCATGAATCTGCCGAT
GCATTTTCAGGTTCAAACGTCAGAGCCACCTCTCCCTGTGCCGTTGGTGCTGCAACTGCTGTCAACAAGGGCTGTGGCT
TCTGCTGCAAAATTCGAGGACCTGCCAGCACTAAAGCCATTTATTAATCTATCGCCTTTAAATTTGCCCTATTCTTCTA
TGTTTCTTTGGACTCTGTGGAGAAGATGCAATCTCATTGACGCTTTTATCACTGCAACCTCAATCTGT

//

NRC205

AAGATGAAGACATTTCAGTGTTCAGTGGTACCCGTCATTGCAATGTATGTTTCATCCTTGAAAGCACCGCTGTTCTTTCTCCGAGGTG
CGAACGGAGGAGGTTGGAAGCTTTGACAGTCCAGTTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCACGTCCATGAATCTGCCGATGCATTT
AGGTTCAAGCGTCAGAGCCACCTCTCCCTGTGCCGTTGGTGCTTCAACTGCTGTCAACAAGGGCTGTGGCTTCTGCTGCAAAATTC
TGAGGACCTGCCAGCA

//

NRC206

TAAGATGAAGCAATTTCAGTGTGGCAGTGGTACTCGTCATGGCATGTATGTTTCATCGTGGAAGCACCGCTGTTCTTTCTCCGAGGT
GCGAACCGGAGGAGGTTGGAAGCTTTGACAGTCCAGTTGGGGAACATCAACAGCCGGGCGGCAGTCCATGCATCTGCCGAGCCCTT
CAGGTTCAAGCGTCAGATCCACCTCTCCCTGTGCCGTTTGTGCTGCAACTGCTGTCAACAATTGGCTGTGGCTTCTGCTGCAAAATTC
CTGAGACTGCCAGCA

//

NRC207

ACGAGGCACACGCTGACCAGGGGGTCAACCAACTTCTGAAGAGACCCAGGTTCTTAGAGAGCCACTAGAGAATCACCCG
GGAGCCCCGAAGAACACAGGACGCTGCGGTGCTCGTGGTGGCCGGACCCATGAGACAGAAGACCTACAGCCTCTCAG
CTTCAGAAAGGATTTCTGACTCAGCATCTAAACCTTCCCTCAAATGAAGGCATTTCAGCATTGCAAGTGCAGTGCAGTCTC
GTGCTCGCCTTTGTTTGCATTTCAGTGCAGCTCTGCCGTCCCATTCGAAGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAGGCGGGGCA
TGACACTCCAGTTGCGGAACATCAAGTGATGTCAATGGAATCTGGATGGAGAATCCACCAGGCAGAAAGCGCCACATCA
GCCACATCTCCCTGTGCCGCTGGTGCTGCAACTGCTGCAAGGCCAAACAAGGGCTGTGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAGGA
TTCCCGCAACACAACCTCACAATGTATTAATTTATTAACATTTTGTGCGAGAAATGTCCTTTTCTTGACCTCTTTTGT
ATTTGTATTAATCTTTTAAATAAAACGGGGTACGATTCATGGAATAAACCTTTGAATAAAATAAAAAAATAAAAAA
AAAAAC

//

NRC208

AAGATGAAGACATTTCAGTGTTCAGTTGCAGTGACACTCGTGCTCGCCTTTGTTTGCATTTCAGGACAGCTCTGCCGCTCCATTCCAG
GGGGTAAGAACGCAACTTTAATCGCTTCATTGCTTATTAGCCATAAATGTTTTGTTCAGGATGCTGAGACACGGCTCCTAAATGTG
TATAATTCATTAAACAGGTGCAGGAGCTGGAGGAGGAGGGGCAATGACACTCCAGTTGCGGCACATCAAATGATGTCAATGGAATC
GTGGATGTGTATGTTCAATCTGTTCATCGACTGGATGAATTAAGCCAATTACTGTGAGCGCGTTAAACATTTAAGTGCTGTGTTCCA
GCCCGGTGCTGTAGGGAATAAAACCCCTCGTTTCATGTGCTTGTCCGTCACAGGAGAGTCCCGTCAGGCAGAAGCGTCACATCAGC
CACATCTCCATGTGCCGCTGGTGCTGCAACTGCTGCAAGGCCAAGGGCTGTGGCCCTGCTGCAAAATTCGAGGACCTGCCAGCA

//

NRC209

AAGATGAAGACATTTCAGTGTTCAGTGCAGTGCAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGGCACCTTTCTGAG
GTAAGCTCCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTTCATCAACAGACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCA
GGTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGCAGCAATGACATGACAGTGTGCAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCATGGATGGTAGGTTT
AGTTTCACTGAATGGATCAAACCAATTCATCAGACCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTTAGTCTCAAAGGTGCGCTGAAGCTCA
GTTTACACAAGCAGTGAAAAACAAACAGAAAGTTATGATGATGCTGATGAACCTTCTCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGC
CATAACAACAGACAGAAGCGTGCCTTCAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAGTTCT
GAGGATTCCTGCTCCAACAAC

//

NRC210

ACGAGCTGACAGGAGCTGACAGGAGTCAACAGCAGAGTCAAAGAACTAAACAATTAACTCAGTCAAACCTCTCAAAGATG
AAGACATTTCAGTGTTCAGTGCAGTGGCCGTCGTCCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCTCCTTTCTGTA

GGCACAAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAGCATCAGGAGACACCAGTGGACTCGTGGATGA
TGCCATACAACAGACAGAGCGTAGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGC
TGCAAGTTCTGAGGATTCCTGCTCCAACAACCATCAAATATTCATTGTGTTTGGCTTTTGTCTTAAAGTTCAATGAACATA
TAAACATATTTCTGGTTGAGCATGTGATAGTTTAATGGTGTTACTCATTGGTTCATGGTATAGTCAAGTGTTCAGAGATG
TGATTGTATCACCACATATTTCTCTGTTAGGTGTATTTCAATAAATGCCAATGATCCTTTGAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

//

NRC211

ACGAGCGGCACGAGGTGAACCTGACAGGAGCTGACAGGAGTACCAGCAGAGTCAAAGAATAAACTTAACTCAGTCA
AACTCTCAAAGATGAAGACATTCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCT
GCCTCCTTTCTGAGGCACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACACCAGT
TGACTCGTGGATGATGCCAAACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGT
TCTGTGGACTGTGCTGCAAGTTCTGAGGATTCCTGCTCCAACAACCATCAAATATTCATTGTGTTTGGCTTTTGTGTTTAA
AGTTCAATTGAACATATACATATTTCTGGTAGACATGTGATAGTTTAATGGTGCTACTCCTTGGTTCATGGTGTAGTTA
AGTGTTTCAAGATGTGATTGTATCACCACATATTTCTCTGTTAAGGTGTATTTCAATAAATGTTAATGCTCCTTTGAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

//

NRC212

ACGAGACTGACAGGAGCTGACAGGAGTACCAGCAGAGTCAAAGAATAAACTTAACTCAGTCAAACCTCTCAAAGAT
GAAGACATTCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTCTG
AGATGCCATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCGGAGCTGGTGTCTGTGGAATG
TGCTGCAAGTTCTGAGGATTCCTGCTCCAACAACCATCAAATATTCATTGTGTTTGGCTTTTGTCTTAAAGTTCAATTGAA
CTATAACATATTTCTGGTTGAGCATGTGATAGTTTAATGGTGTTACTCATTGGTTCATGGTATAGTCAAGTGTTCAGAG
ATGTGATTGTATCACCACATATTTCTCTGTTAGGTGTATTTCAATAAATGCCAATGATCCTTTGAAAAAAAAAAAA

//

NRC213

AAGATGAAGACATTCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCTCCTT
TCCTGAGGTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCATCATACTGAGACTTGAT
TCCTTCTTTATCAGGCACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAGCATCAGGAGACACCAGTG
GACTCCAGGAGTGAATGTGTTTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGTTTACACAAGCAGAGAAAAACAAACAGAGTAA
GTTATGATGATGCTGATGAAGGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATTCATACACAAGCAGAGCGTAGCTT
TAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAGTTCTGAGGATTCCTGCTCCAAC
AAC

//

NRC214

AGATGAAGACATGTCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCTCCTTT
CCTGAGGTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCATCATACTGAGACTTGAT
CCTTCTTTATCAGGTACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACACCAGTTG
ACTCGTGGATGGTAGGTTCACTGATGATCAATCCATTTACATCAGATCTTTAGATGGAAGTGAATGTGTTT
TAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGTTTACACAAGCAGAGAAAAACAAACAGAGTAAAGTTATGATGATGCTGATGAAG
GTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCCAAACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGG
CTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAGTTCTGAGGATTCCTGCTCCGACAA

//

NRC215

AAGATGAAGACAATCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCTCCTT
TCCTGAGGTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTAAATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGAT
TCCTTCTTTATCAGGCACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAGCATCAGGAGACACCAGTG
GACTCAGGATGGTAGGTTCACTGATGATCAATCCATTTACATCAGATCTTTAGATGGAAGTGAATGTGTTT
TTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGTTTACACAAGCAGAGAAAAACAAACAGAGTAAAGTTATGATGATGCTGATGAAG
GTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATTCATACACAAGCAGAGCGTAGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGG
CTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATTCTGAGGACCTGCCAGCA

//

NRC216

AAGATGAAGACATTCAGTGGTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCTCCTT
TCCTGAGGTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGAT
TCCTTCTTTATCAGGTACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACACCAGTT
GACTCGTGGATGGTAGGTTCACTGATGATCAATCCATTTACATCAGATCTTTAGATGGAAGTGAATGTGTTT
TTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGTTTACACAAGCAGAGAAAAACAAACAGAGTAAAGTTATGATGATGCTGATGAAG
GTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCCAAACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGG
CTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATTCTGAGGACCTGCCAGCA

//

NRC217

AAGATGAAGACATCAGTGGTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATAGCTTCATTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTTATTCCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGCGCATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCTTTAGATGGAAGCGAATGTGTTTGTAGTCAAAAAGTGACCTGATGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAAACAGCAGAGTAAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACCGAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATTCTG
AGGATTCCTGCTCCAACAAC

//

NRC218

AAGATGAAGACATTCAGTGTGGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATAGCTTCATTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTTATTCCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGCTGAGCAATGACAATGCAGCCGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCTTTAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAGAAGTGCCCTGATGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAAACAGCAGAGTAAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACCGAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGTAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATTCTG

AGGATTCTGCTCCAACAAC

//

NRC219

AAGATGAAGACATTTCGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATAGCTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCCGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAAGTGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGATGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAAACAAGCAGAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACAGAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTG
AGGATTCTGCTCCAACAAC

//

NRC220

AAGATGAAGACATCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
TAAGCACCTGACTTCAGATAGCTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTTATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGCACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGAAGTGAAGTGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGATGCTCAGT
TTACACAAGCAGAGAAAAACAAGCAGAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
TACAACAGACATAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTGA
GGATTCTGCT

//

NRC221

AAGATAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAGG
TAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCAGG
TACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTTGTGGATGGTAGGTTCA
TTCAGTGAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGT
TTACACGAGCAGAGAAAAACAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
TACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGCCCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATTCTGA
GGATTCTGCTCCAACAAC

//

NRC222

AAGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCGAGTGGCCGTCGTGCTCATCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATAGTTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTTATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCATTGGACTCATGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAAGTGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGATGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAAACAAGCAGAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTG
AGGACCTGCCAGCA

//

NRC223

AAGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATAGTTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTTATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCATTGGACTCATGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTCAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGATGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAAACAAGCAGAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACATAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTG
AGGACCTGCCAGCA

//

NRC224

AGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAGG
TAAGCACCTGACTTCAGATAGTTTCATTTGCTTGTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCAGG
TACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
TTCAGTGAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGATGCTCAGT
TTACACAAGCAGAGAAAAACAAGCAGAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
TACAACAGACCGAAGCGTAGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTGA
GGACCTGCCAGCA

//

NRC225

AAGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCATCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTCTCTGAG
GTACAAGGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGATGCCATAC
AACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGGCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATCTGAGGA
TTCCTGCTCCAACAAC

//

NRC226

AAGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTTGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACGAGCAGAGAAAAACAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGACCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATTCTG
AGGATTCTGCTCCAACAAC

//

NRC227

AAGATGAAGACATTTCAGTGGTTGCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTCTTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTTGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTCACATCAGATCTTTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACGAGCAGAGAAAAACAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
TACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGACCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATTCTG
AGGATTCTGCTCCAACAAC

ATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGTCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATTCTG
AGGATTCCTGCTCCAAC
//
NRC228
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACGAGCAGAGAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGCTCTCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGTCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAAAATCTG
AGGACCTGCCAGCA
//
NRC229
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACGAGCAGAGAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGCTCTCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCC
ATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGACCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAAAATCTG
AGGACCTGCCAGCA
//
NRC230
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGATGCCATAC
AACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGACCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAAAATCTGAGGA
CCTGCCAGCA
//
NRC231
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGATGCCATAC
AACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGTAAGTTCTGCTGCGGCTGCTGCAGGCTGGTGTCTGTGGACTTTGCTGCAGATTCTGAGGA
TTCTCTGCTCCAACAA
//
NRC232
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
CTGATGAACGCTCTCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCCATACAACAGACAGAAGCGTAGCTTTAAGTGCAAGTTCTGCTGC
GGCTGCTGCAGAGCTGGTGTCTGTGGACTGTGCTGCAAAATCTGAGGATTCTGCTCCAACAA
//
NRC233
AAGATGAAGACTATCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCCTCTTCATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGCTCTCTCATGTCTCATGTCTCATGTCTCTCACAC
AGATGCCATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGCAAGTTCTGCTGCGGCTGCCGCTGTGGTGTCTCTGTGGACTGTGCTGCA
AATTCTGAGGATTCTGCTCCAACAA
//
NRC234
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG
GTAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAG
GTACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
GTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAG
TTTACACAAGCAGAGAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGCTCTCTCATGTCTCATGTCTCATGTCTCTCACAC
AGATGCCATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGCAAGTTCTGCTGCGGCTGCCGCTGTGGTGTCTCTGTGGACTGTGCTGCA
AATTCTGAGGACCTGCCAGCA
//
NRC235
AAGATGAAGACATTCACTGTTGCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAGG
TAAGCACCTGACTTCAGATCGTTTCATTTGCTTGTAGCCTTGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGATTTCTTCTTTATCAGG
TACAAGAGCTGGAGGAGGAGTGAAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCGTGGATGGTAGGTTCA
TTCCCTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCCTTCAGATGGAAGTGAATGTGTTTGTAGTCACAAAAGTGCCCTGAAGCTCAGT
TTTACACAAGCAGAGAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACATCTCTCATGTCTCATGTCTCATGTCTCTCACAC
GATGCCATACAACAGACAGAAGCGTGGCTTTAAGTGCAAGTTCTGCTGCGGCTGCCGCTGTGGTGTCTCTGTGGACTGTGCTGCA
ATTCTGAGGACCTGCCAGCA
//
NRC236
ACGAGCTGACAGGAGCTGACAGGAGTCAACAGCAGAGTCAAAGAACTAAACAACTTAAGTCAAGTCAAACTCTCAAAGATGAAGACAT
TCAGTGTGTCAGTCAAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAGGTACAGAGCTGG
AGGAGCAGCTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAGCATCAGGAGACACAGTGGACTCAGGGATGATGCCAAACACAGACAGAAGC
GCAGCGCCGATTGTTGGCCATGTTGCAATCAAATGGCTGTGGAACCTTGCTGCAAGGTCTAAACAGACTCTTGGGCAGATCAATCCA
GGTTGCTCTTTGCTGCTCTCCGTGGAGTCAACACAGAGACCTTCTCAGCCATAGTCAAGTTTCTGCCACTAGACCAACCGCCTC
TCCCTCATCAAACTACTCAATGTTTTTCAATTTGTCTTAAAGTTCATTGAACATATAACATATTTCTGGTAGAGCATGTGATGTTTA
ATGGTGTACTCATGTTGTTTATGGTATAGTCAGATGTGATTATATCATCACAATATTTCTCTGTTAAGGTGTACTG
TCAATAAATGTCAATGCTCCTTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

```
//  
NRC237  
CGTGCTCGTCTTTATTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAGGTGAGCTCCTGACTTCAGATCGTTTCATTAGCTTGTT  
ATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGAATCCTTCTTTATCAGGTACAGGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATG  
CAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCATGGATGGTATGTTTCAGTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCT  
TTCAGATGGAAGTGAATTTGTTTTAGTCCCAAAGTGCCCTGAAGCTCAGTTTACACANGCAGAGAAAAACAAAACACAGTAAGTTA  
TGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGATGCCATACAACAGACAGAAGCGCAGCGCCGAGTGTAGCT  
TCTGCTGCAATGAATCTGGCTGTGGAATTTGCTGCAAATTCAGAGGATTCCTGCTCCAACAACAAGGGCGAATTC  
//  
NRC238  
AAGATGAAGACATTCAGTGTGTCAGTCACAGTGGCCGTCGTGCTCGTCTTTATTTGTATCCAGCAGAGCTCTGCCACCTTTCTGAG  
GTGAGCTCCTGACTTCAGATCGTTTCATTAGCTTGTTATCCATGAATCTCTCATCAACATACTGAGACTTGAATCCTTCTTTATCA  
GGTACAGGAGCTGGAGGAGGCAGTGAGCAATGACAATGCAGCTGCTGAACATCAGGAGACATCAGTGGACTCATGGATGGTATGTTTC  
AGTTCACTGAATGGATCAAACCAATTACATCAGATCTTTAGATGGAAGTGAATTTGTTTTAGTCCCAAAGTGCCCTGAAGCTCA  
GTTTACACAAGCAGAGAAAAACAAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATGTCTCTCACACAGAT  
GCCATACAACAGACAGAAGCGCAGCGCCGAGTGTAGCTTCTGTGCAATGAATCTGGCTGTGGAATTTGCTGCAAATTCAGAGGACC  
TGCCAGCA  
//  
NRC239  
GTGGAGGAGCCAGTGAGCAGTGAGAATGGAGCAAATGAACACACATAAGATCTTTCGGATGGAAGTGATGTGTTTTAGTCACATGA  
GTGGCTCGAAGCTCAGTACACACGAGCAGAGAGAACGAACACAGTGTGTTTTATTCTGCTTGTGTAAACTGAGCTTCAGTTTACACA  
AGCAGAGAAAAACAAACACAGTAAGTTATGATGATGCTGATGAACGTCTCCTCATGTCTCATATCTCTCACACAGATGCCAAACA  
GACAGAAGCGTGGCTCTAATTGCAAACCATGCTGCAATCATAAATGGCTGTGGAACGTGCTGCGAAGTCTGAGGATTCCTGCTCCACA  
//
```

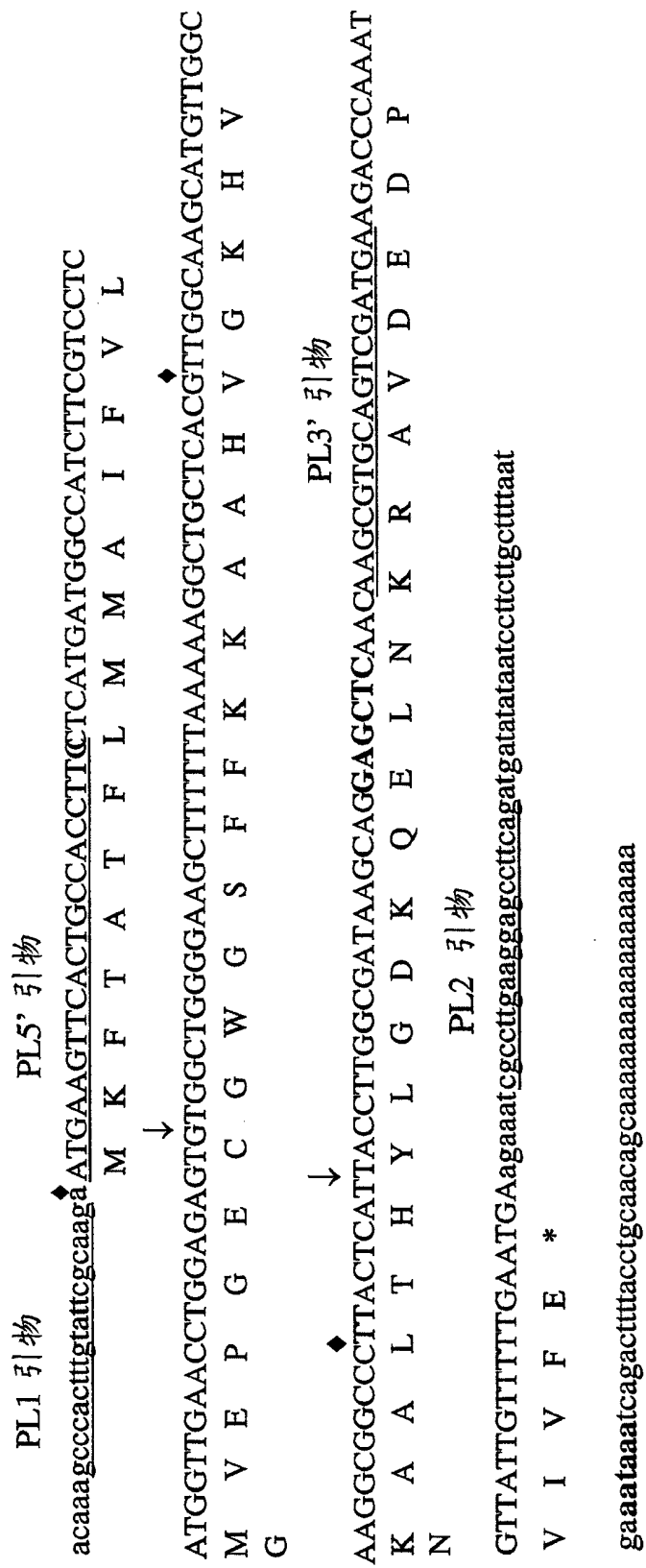


图 1a

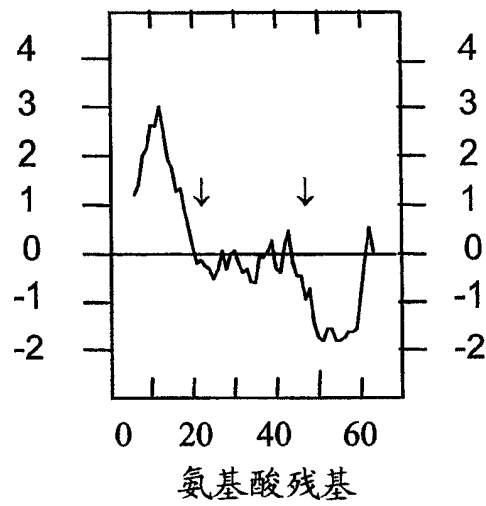


图 1b

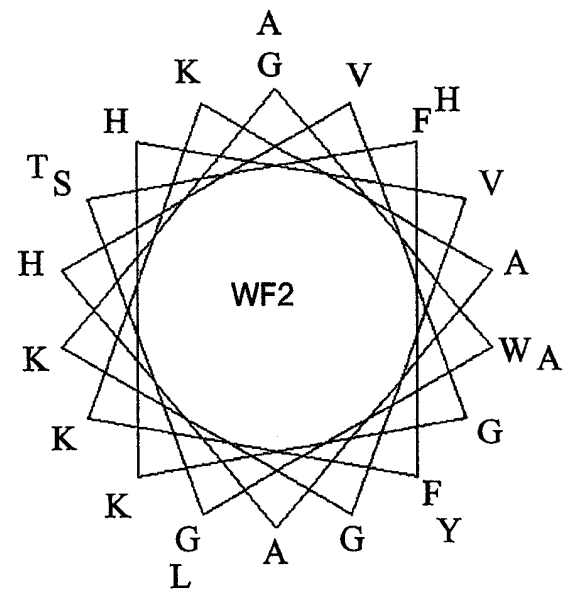
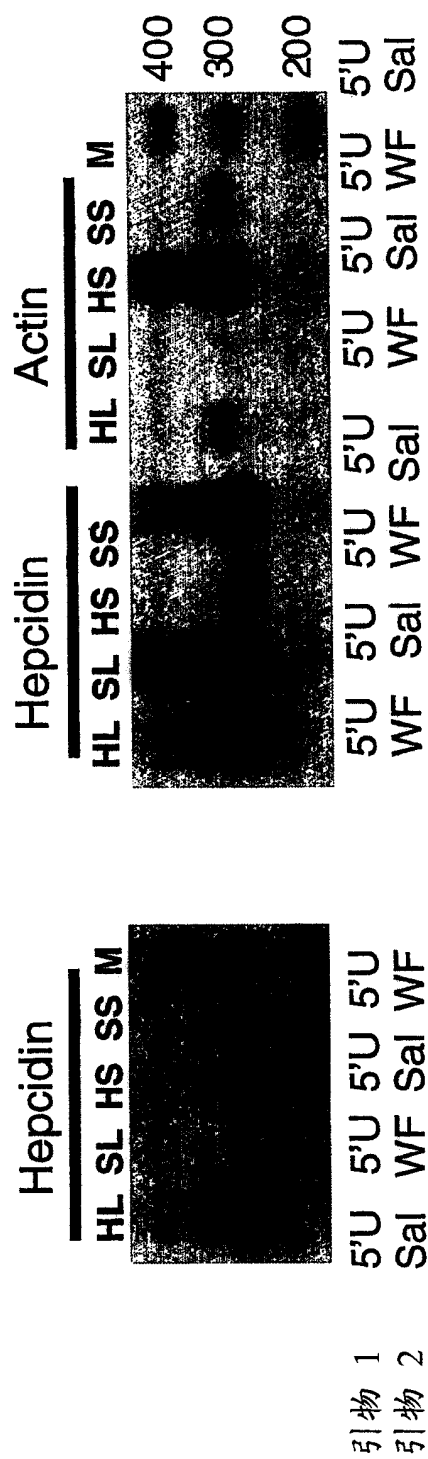


图 1c



2

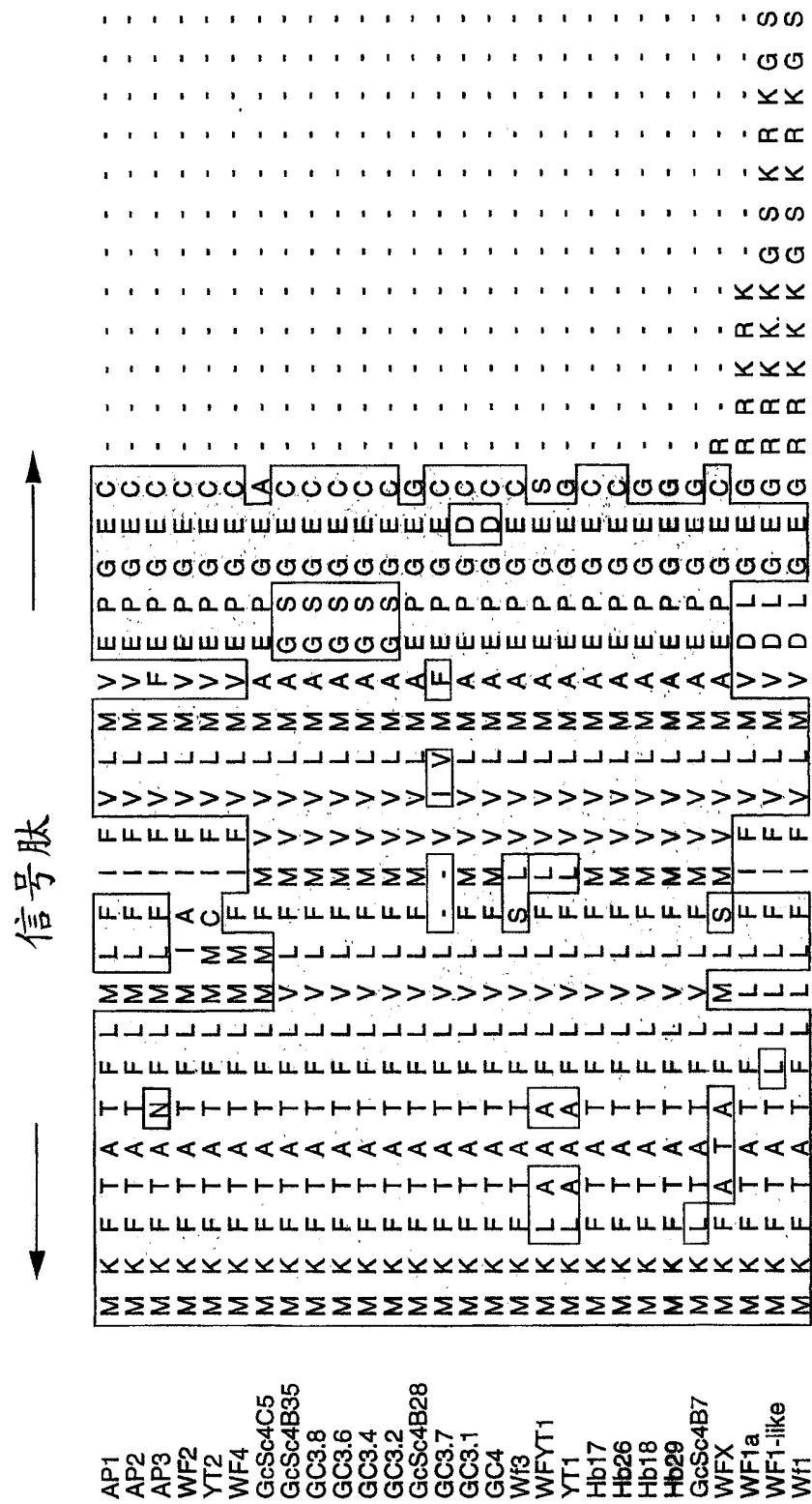


图 3

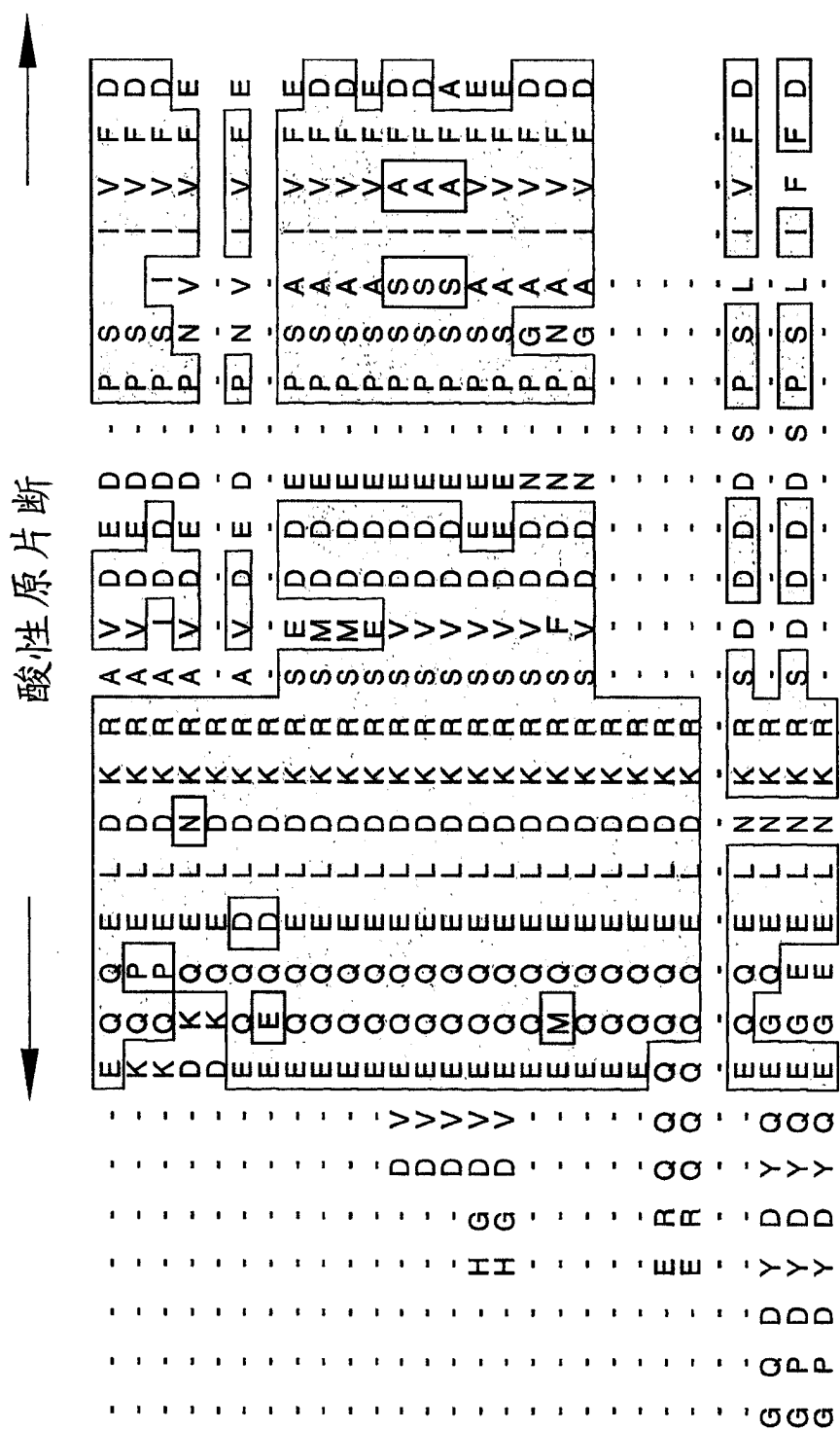


图 3 (再续)

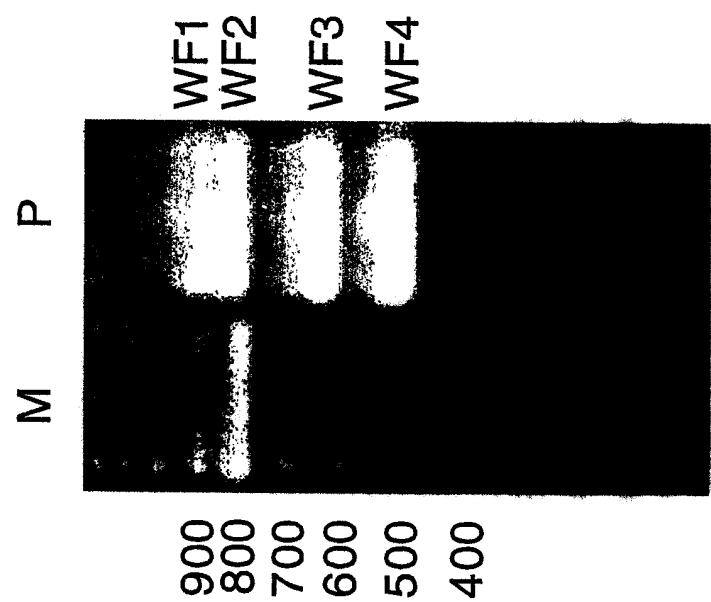


图 4

1 GAATTCGCCCTTGCCCACCTTTGTATTCGCAAG gtaatatcaatattttttca
101 ctgtataatgcaaatgttaatgatctttatcttttctgtttttttttttaga
1
189 TTC GTC CTC ATG GTT GAA CCT GGA GAG TGT GGT TGG GGA
13 F V L M V E P G E C G W G
267 ttaattagcttttaactttgcaaatatgtgttttttttttaacagctggaaa
367 atctaaataacaacctaagggcctttgattagcatgtttcttcaataaaat
467 gtttggttttttacacag CT GCC AAG CAT ATT GGC CAT GCA GCC
35 A K H I G H A A
555 ttatcaccagtattgttattgacaacttctcttttttctgtgatccgactc
45
643 GAC AAG CGC GCA GTC GAT GAA GAC CCA AAT GTT ATT GTT
54 D K R A V D E D P N V I V

图 5

aattcatttagacgagaccaaccttttgggaaatctgctcagcttatta	100
ATG AAG TTC ACT GCC ACC TTC CTC ATG ATG TTC ATC	188
M K F T A T F L M M F I	12
AGC ATT TTT AAG CAT GGT CGT CAT G gtaaagtcacggaa	266
S I F K H G R H A	34
ctcacaaaaataaatagccgatataatttggccaattataatcactttg	366
gattgaacactacttaaaagggtatgtataaaacatcatcatgtgttttt	466
GTT AA gtaaggacttctaccattattactgtataattttgatagta	554
V N	44
atccgcag T CAT TAC CTT GGC GAG CAG CAA GAT CTC	642
H Y L G E Q Q D L	53
TTT GAA TGAaagaatcgcttgaaggagccttcagaagggcgaattc	728
F E *	68

图 5 (续)

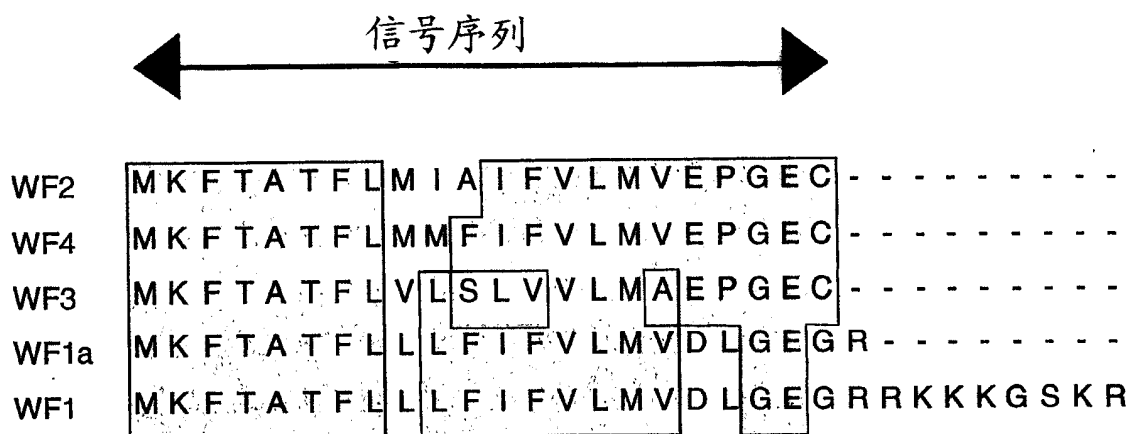


图 6

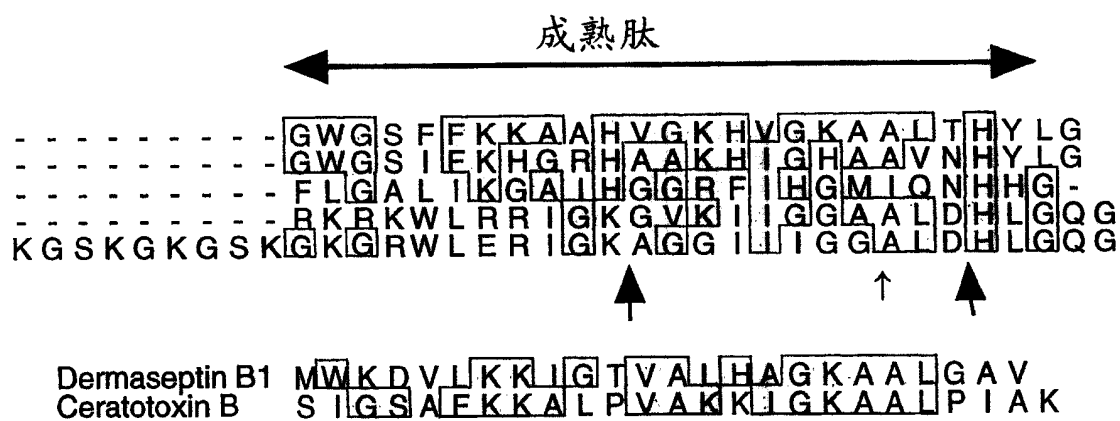


图 6 (续)

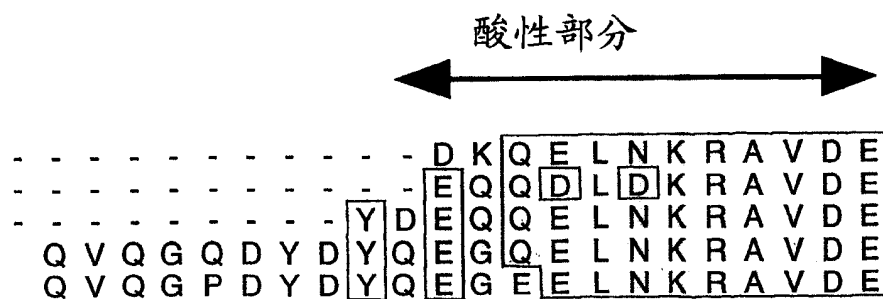


图 6 (续)

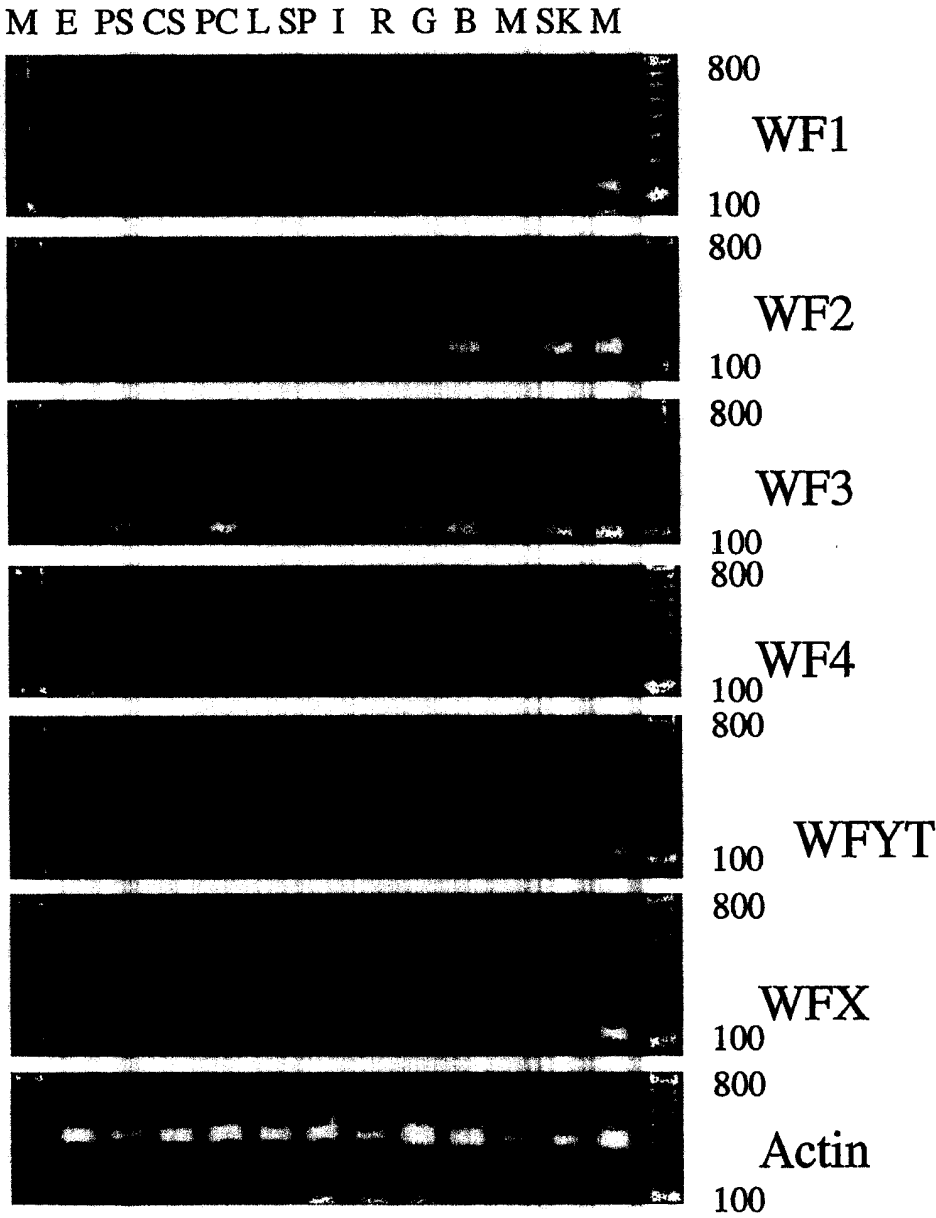


图 7

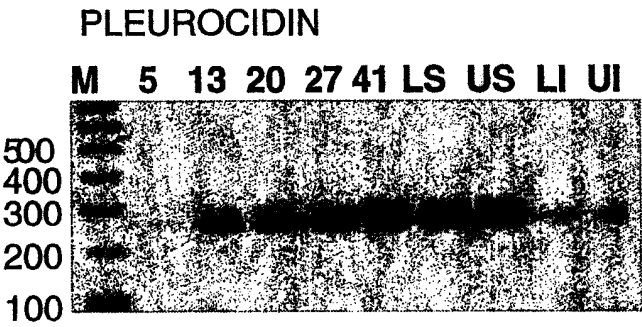


图 8a

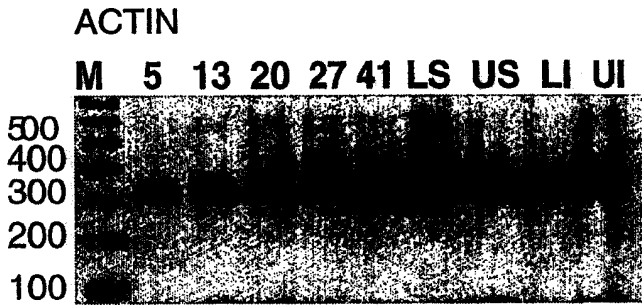


图 8b

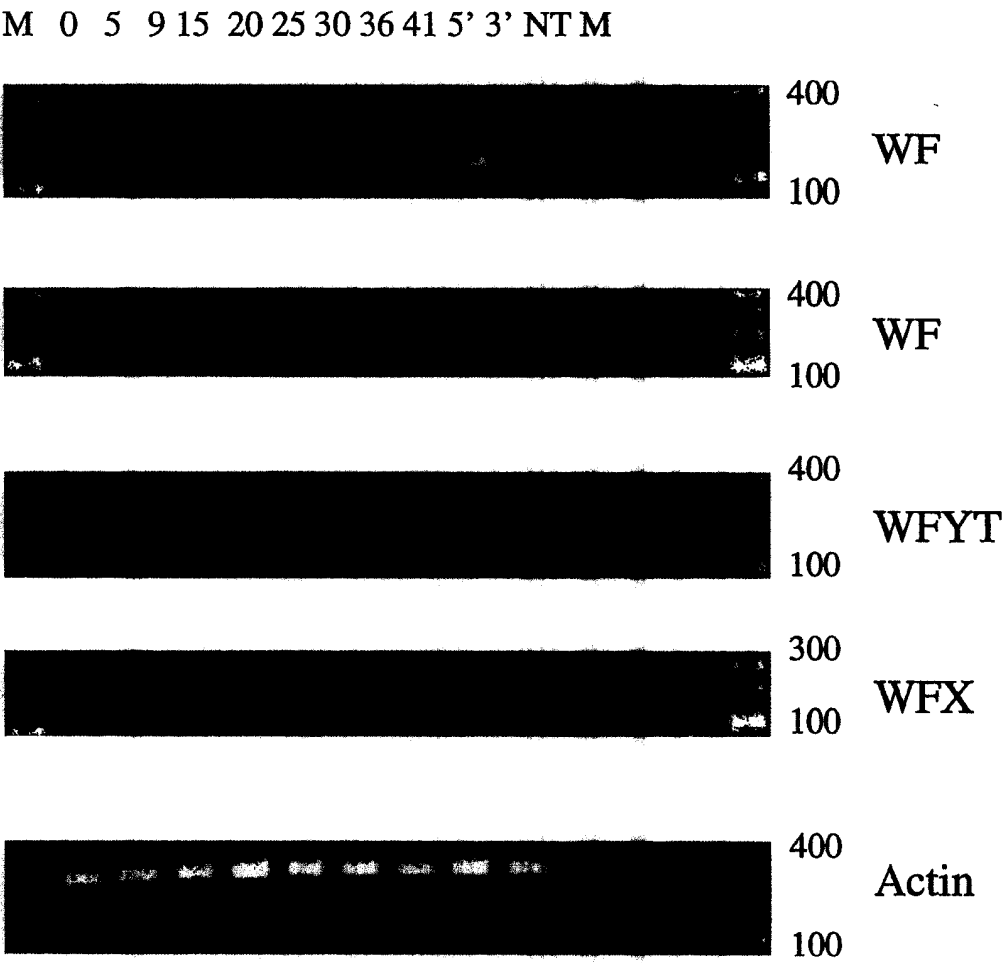


图 9

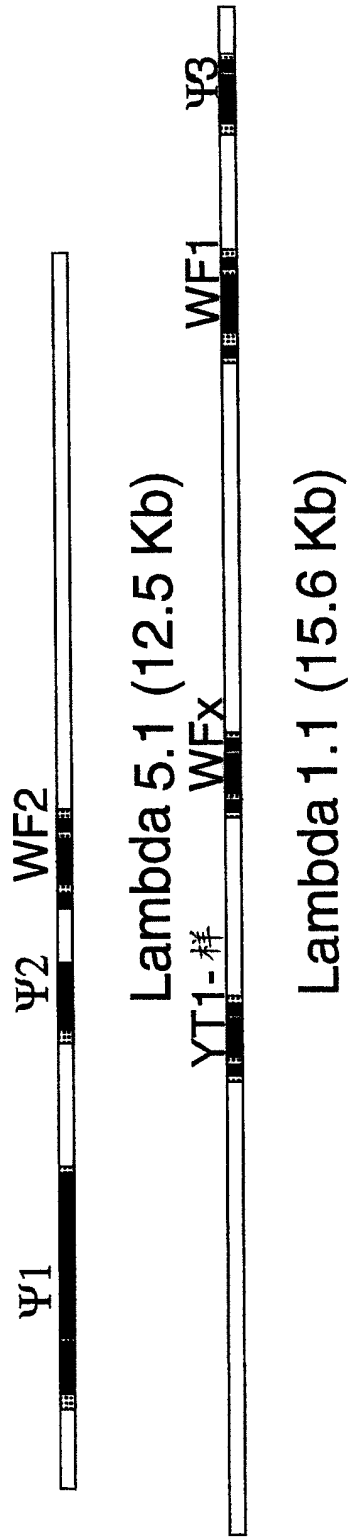


图 11

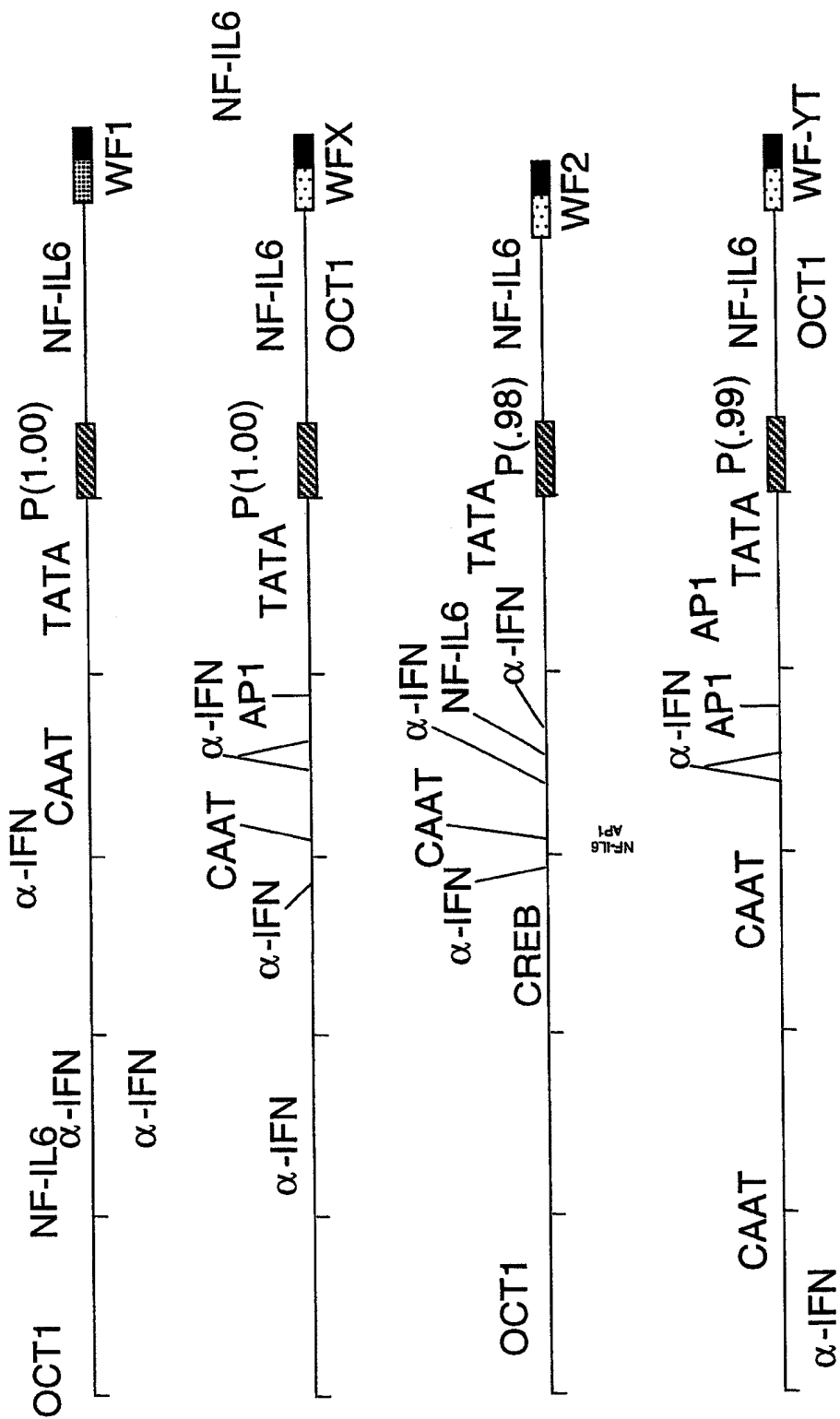


图 12

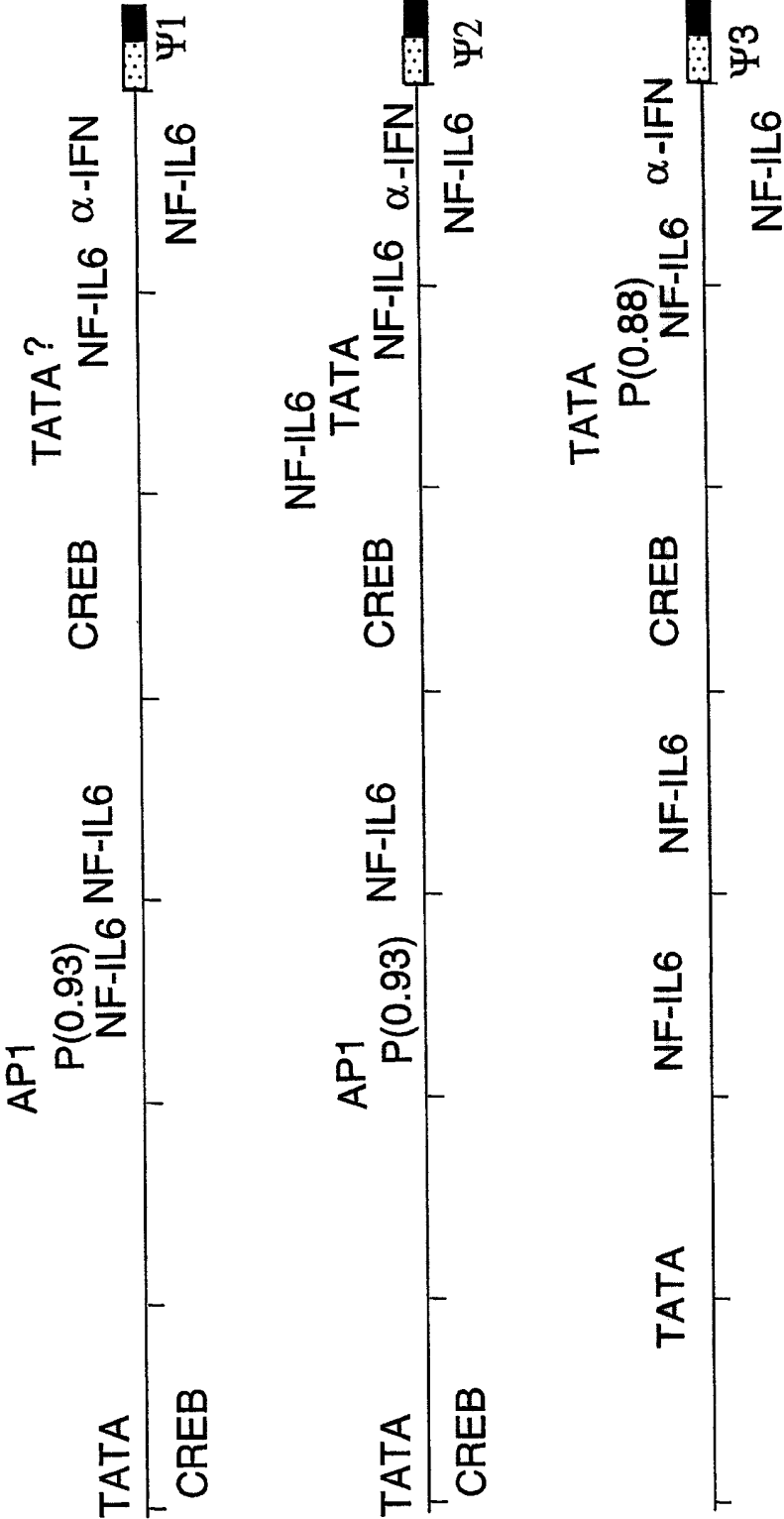


图 12 (续)

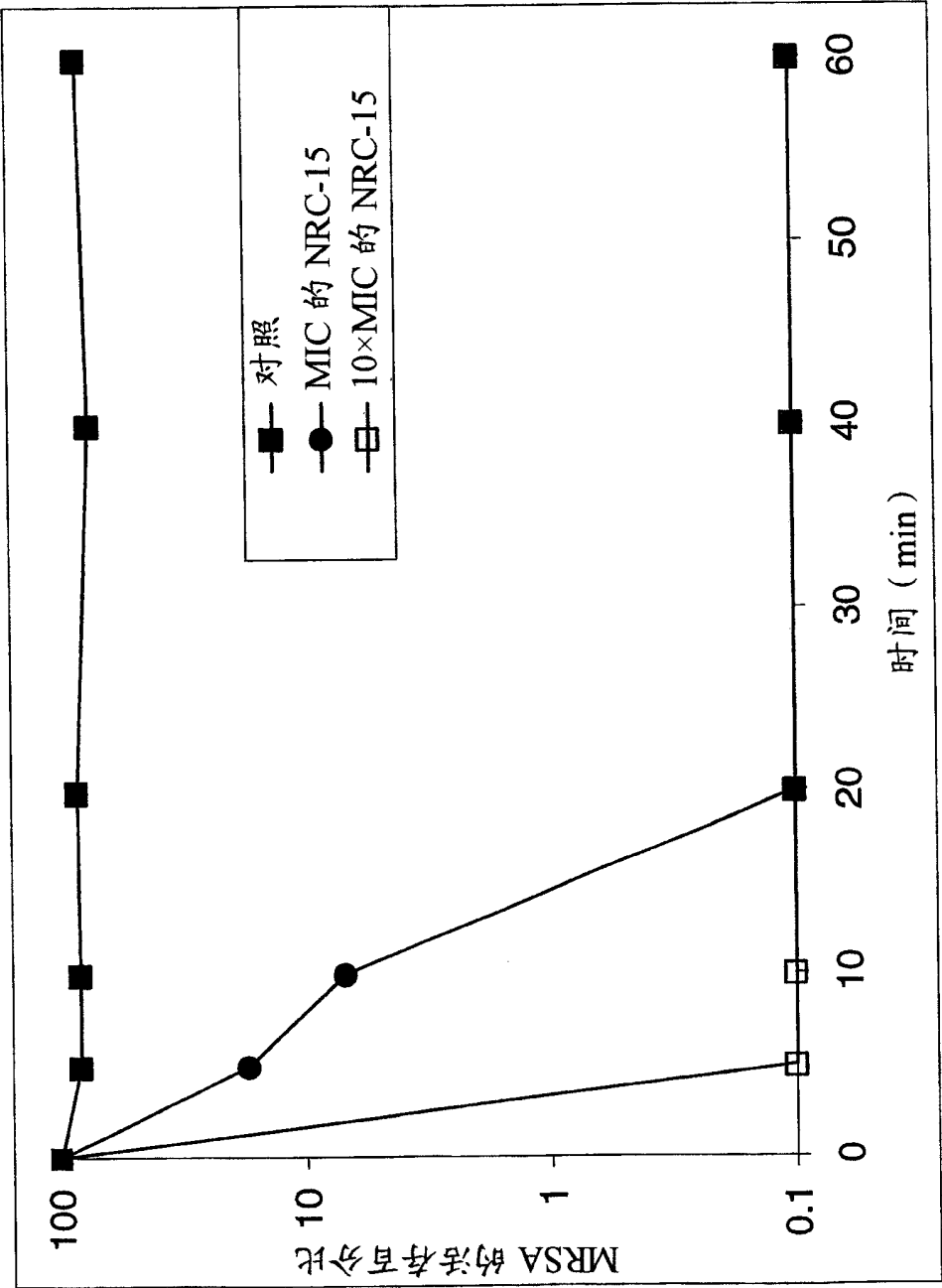


图 13

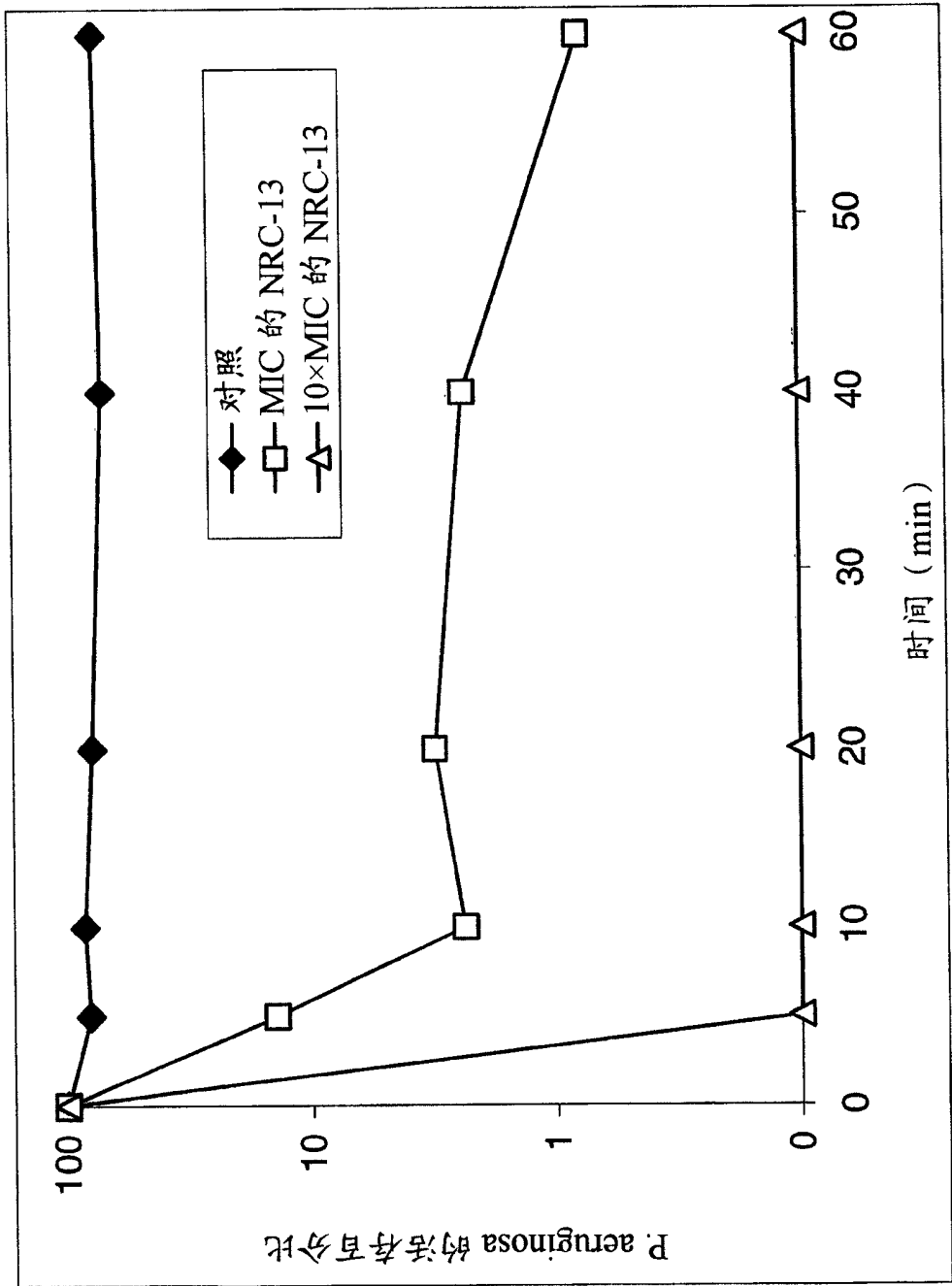


图 14

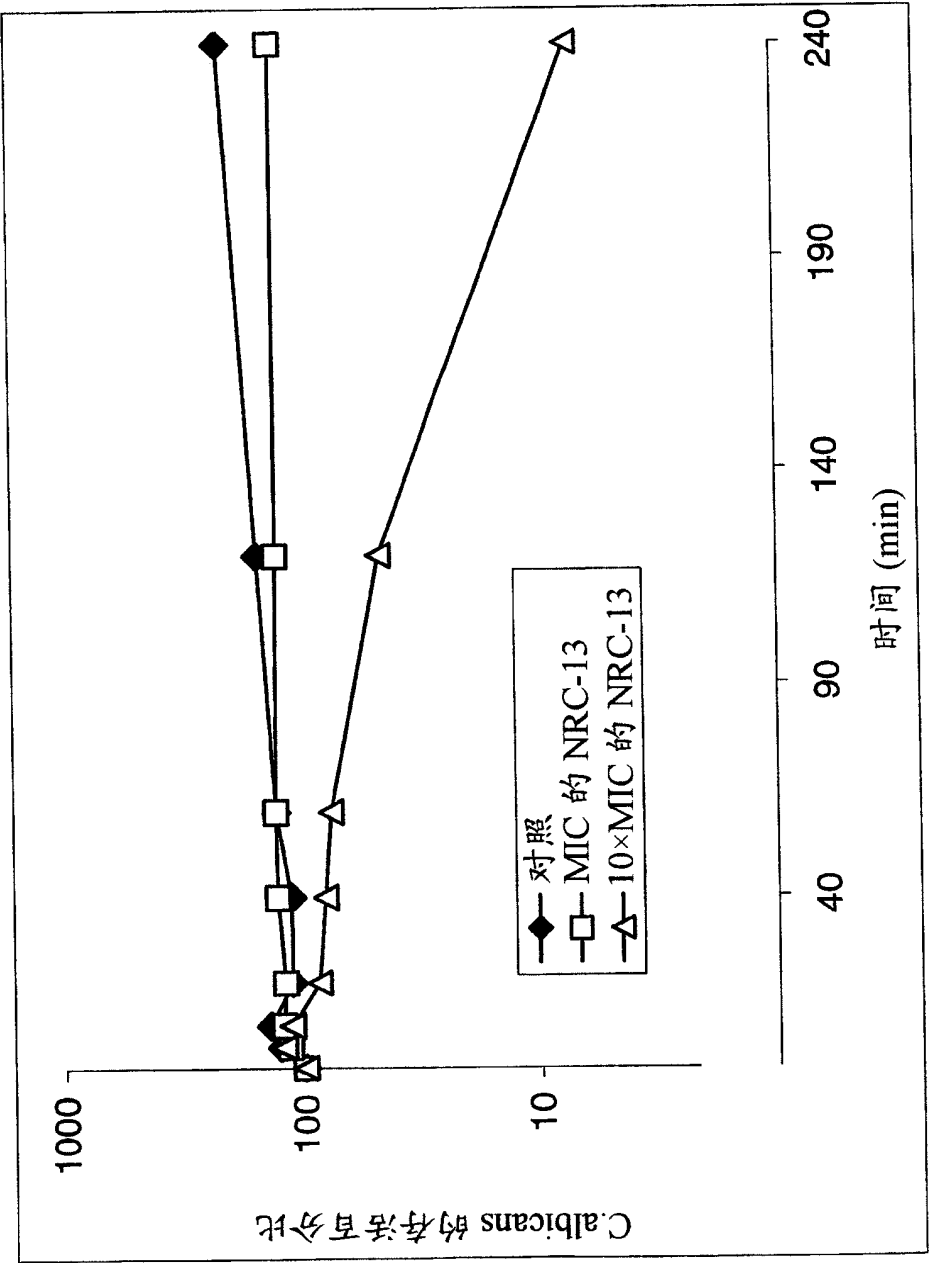


图 15

```
1  ctgacacccaaaagaacaatcaatcaacttttgactcgtcttagtgcatg
101 atcttcctcataaaactgtcacttcaatttcaactgatttcaacaggactt

195 TTT AGT GTT GCA GTG GTA CTC GTC ATT GCA TGT ATG TTC
    F  S  V  A  V  V  L  V  I  A  C  M  F

271 gtcaaattctccaacaccaacccactacaaacatgtgtgcatcgatttta

367 ACG GAG GAG GTT GGA AGC TTT GAC AGT CCA GTT GGG GAA
    T  E  E  V  G  S  F  D  S  P  V  G  E

442 gtacgttcaattgaatgaatgaattacgctaattaccttttagcaaattaa

542 tagctgttaaccattttgattgtgagccgtttagagggcttcagggcgagca

642 cttttttcatattatttttcttggcggggatacag GAG CCT TTC AGG
                                           E  P  F  R

724 TGC TGC AAC TGC TGT CAC AAC ATT GGC TGT GGC TTT TGC
    C  C  N  C  C  H  N  I  G  C  G  F  C

807 tgtttgcaatgttttctttctgagatgttgtttttgtagactatgataatga

907 ctttgaataacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图 16a

```

aaaattgtgcgttggagagcgtcgcttttttgggaacattgaagagttctg
ttaaataaggctataaaacttcctaaaaaaaacgaga ATG AAG GCC
                                         M   K   A

ATC CTT GAA AGC ACC GCT GTT CCT TTC TCC GAG gtat
I   L   E   S   T   A   V   P   F   S   E

gaggttggtcatgactcatttgtgcctaattgtctttgcag GTG CGA
                                         V   R

CAT CAA CAG CCG GGC GGC GAG TCC ATG CAT CTG CCG
H   Q   Q   P   G   G   E   S   M   H   L   P

catttttagtggttgcgtttttaccctcggaatagaattagatcagtagcgc
gtgtgcaacgtggttgtgaagtggagatatacttacttgcttgttccctc

TTC AAG CGT CAG ATC CAC CTC TCC CTG TGC GGT TTG
F   K   R   Q   I   H   L   S   L   C   G   L

TGC AAA TTC TAA ggacctgccccgcaacatttttctagtttgtaca
C   K   F   *

tttataaaatcacttcttattgtgacactttaaaaaaaataaacacatt

```

图 16a (续)

```

1 cgcccttaag ATG AAG ACA TTC AGT GTT GCA GTT GCA GTG
1      M   K   T   F   S   V   A   V   A   V

77 ACC GCT GTT CCT TTC TCC GAG GTG CGA ACG GAG GAG
23 T   A   V   P   F   S   E   V   R   T   E   E

152 CCG GGC GGC ACG TCC ATG AAT CTG CCGgtacgttcaattt
48 P   G   G   T   S   M   N   L   P

243 gtttcacccttggaattgaattagcccactagcgctagttgttaacca

343 tgaagtggagacttggacaaaaatacttaccatgtgcttggttcccacc
57

438 AAG CGT CAG AGC CAC CTC TCC CTG TGC CGT TGG TGC
62 K   R   Q   S   H   L   S   L   C   R   W   C

513 AAA TTC TGA ggacctgccagcaaaggcggaattcgtttaaaacac
87 K   F   *

```

图 16b

```

GTG GTC GTC CTC GCA TGT ATG TTC ATC CTT GAA AGC
V   V   V   L   A   C   M   F   I   L   E   S

GTT GAA AGC ATT GAC AGT CCA GTT GGG GAA CAT CAA CAG
V   E   S   I   D   S   P   V   G   E   H   Q   Q

agtgaatgaattaagtaattaccttttagcaaattaacatctaagtggttgc

tttgattgtgagccggtagagagggcttcagggcgagtagtgtgaatacttg

tttttcattttcttttcttggtgagatacag ATG CAT TTC AGGTTC
                                   M   H   F   R   F

TGC AAC TGC TGT CAC AAC AAG GGC TGT GGC TTC TGC TGC
C   N   C   C   H   N   K   G   C   G   F   C   C

```

图 16b (续)

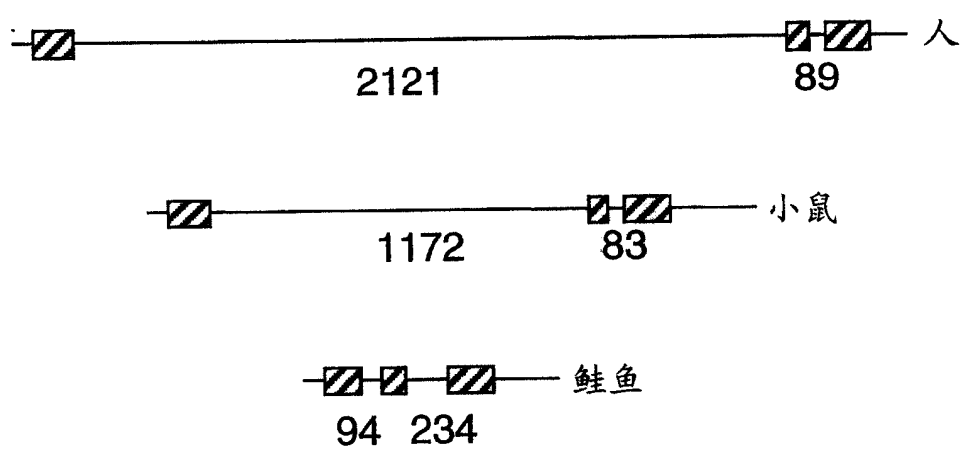


图 16c

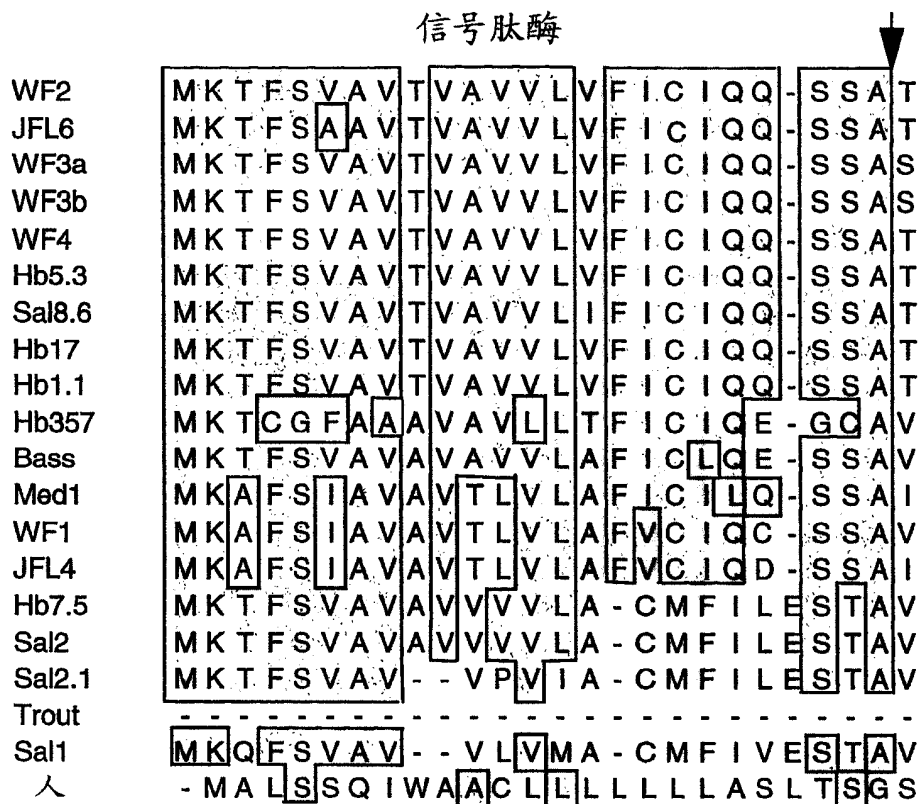


图 17a

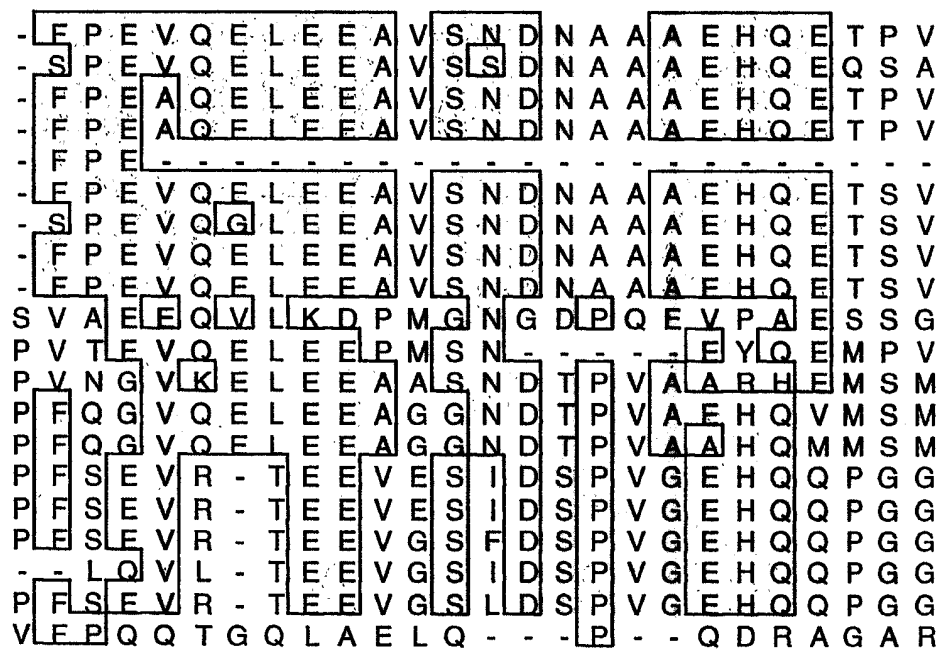


图 17a (续)

终止密码																					
WF1	T	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	T	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3A	T	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	T	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	T	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	T	C	A	T	T	C	T	G	C	C	A
WF3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 18a

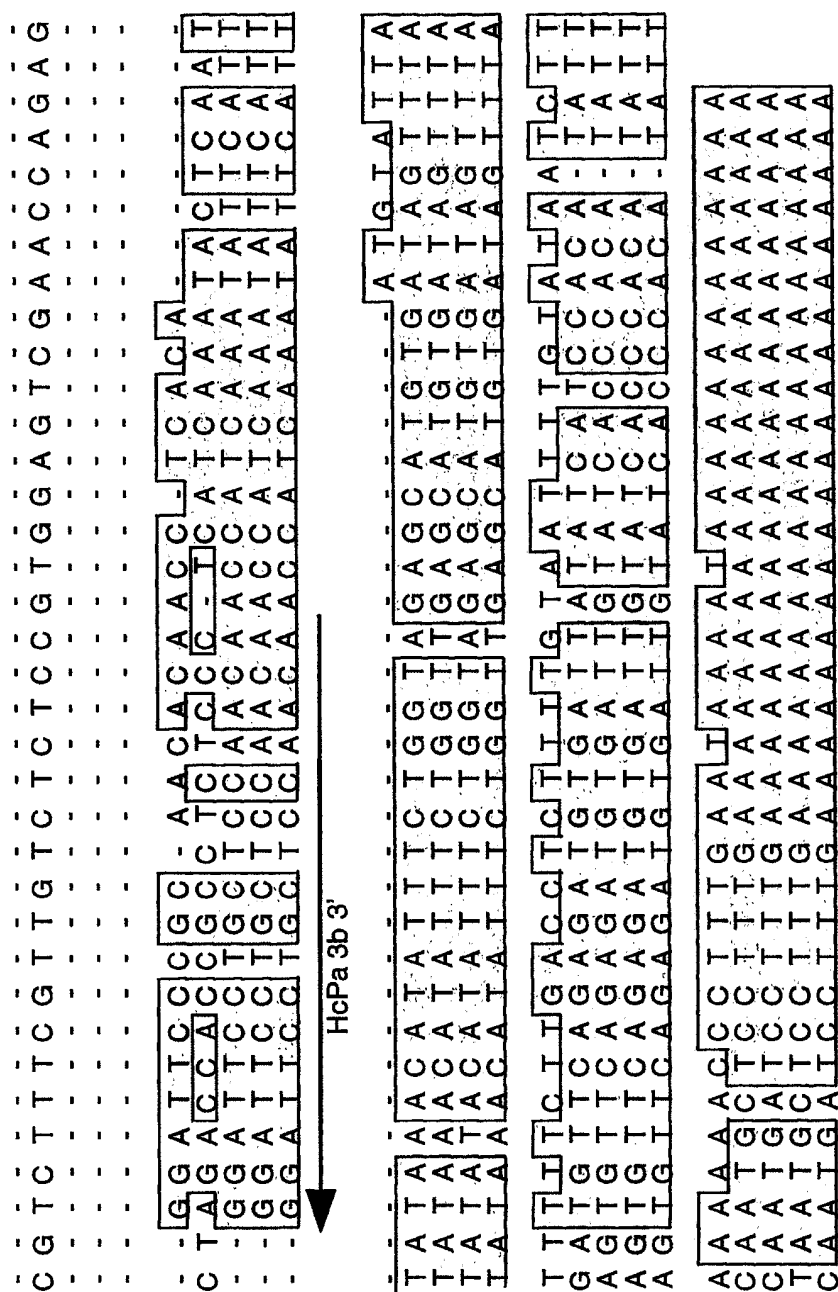
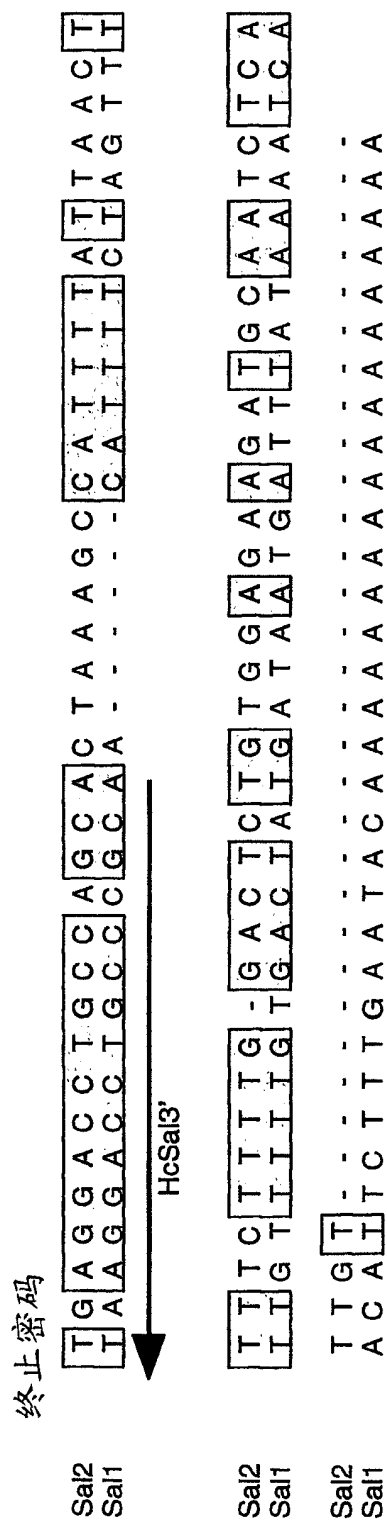
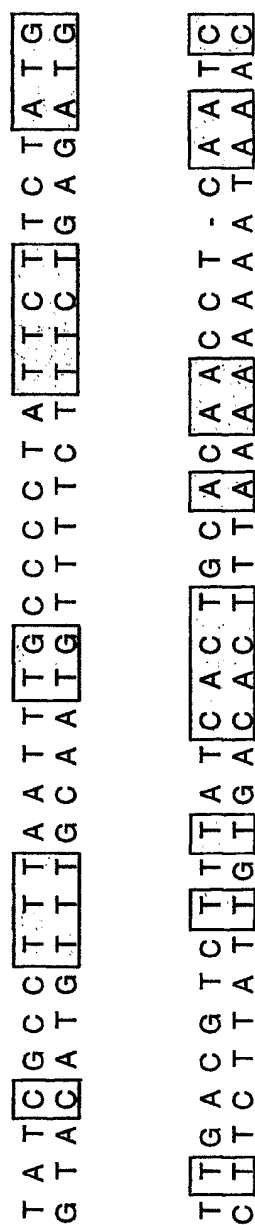


图 18a (续)



186



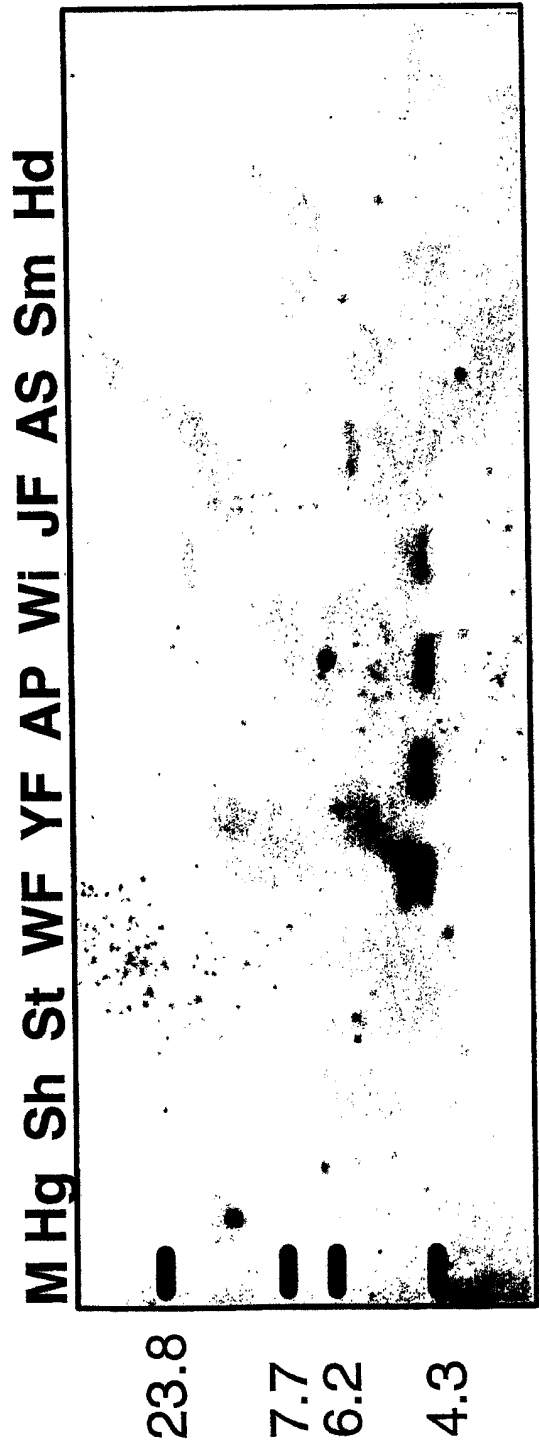


图 19

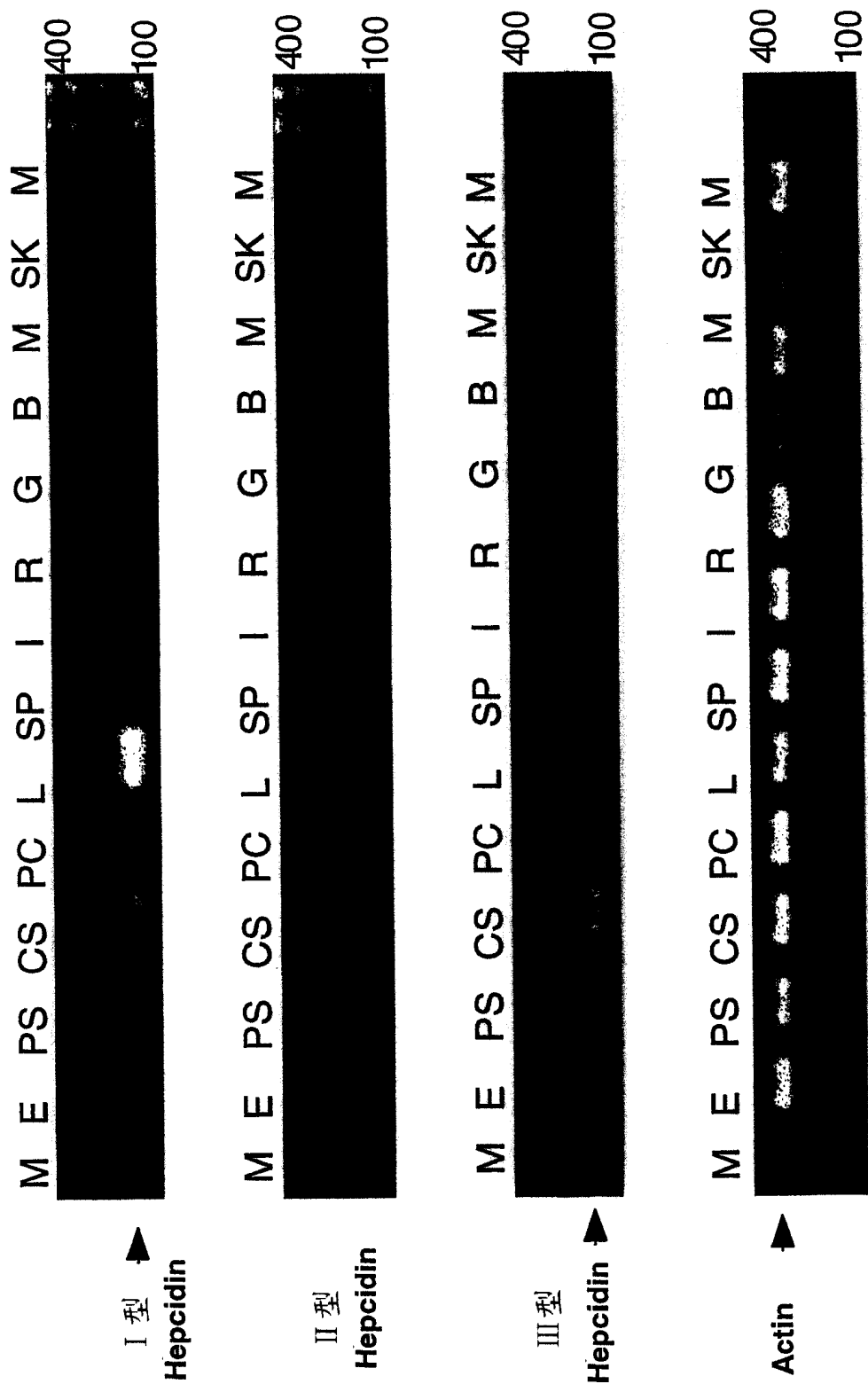


图 20

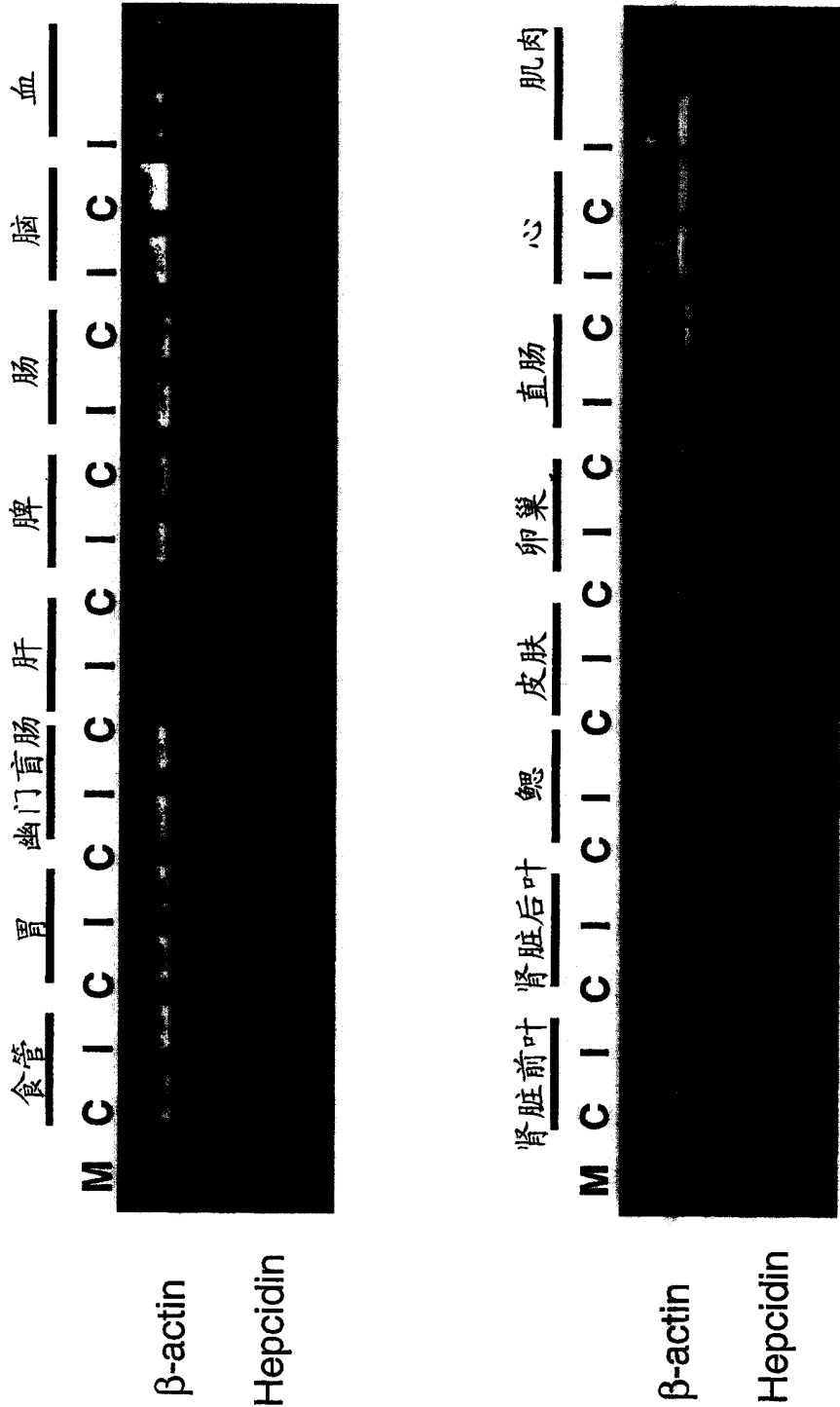


图 21a

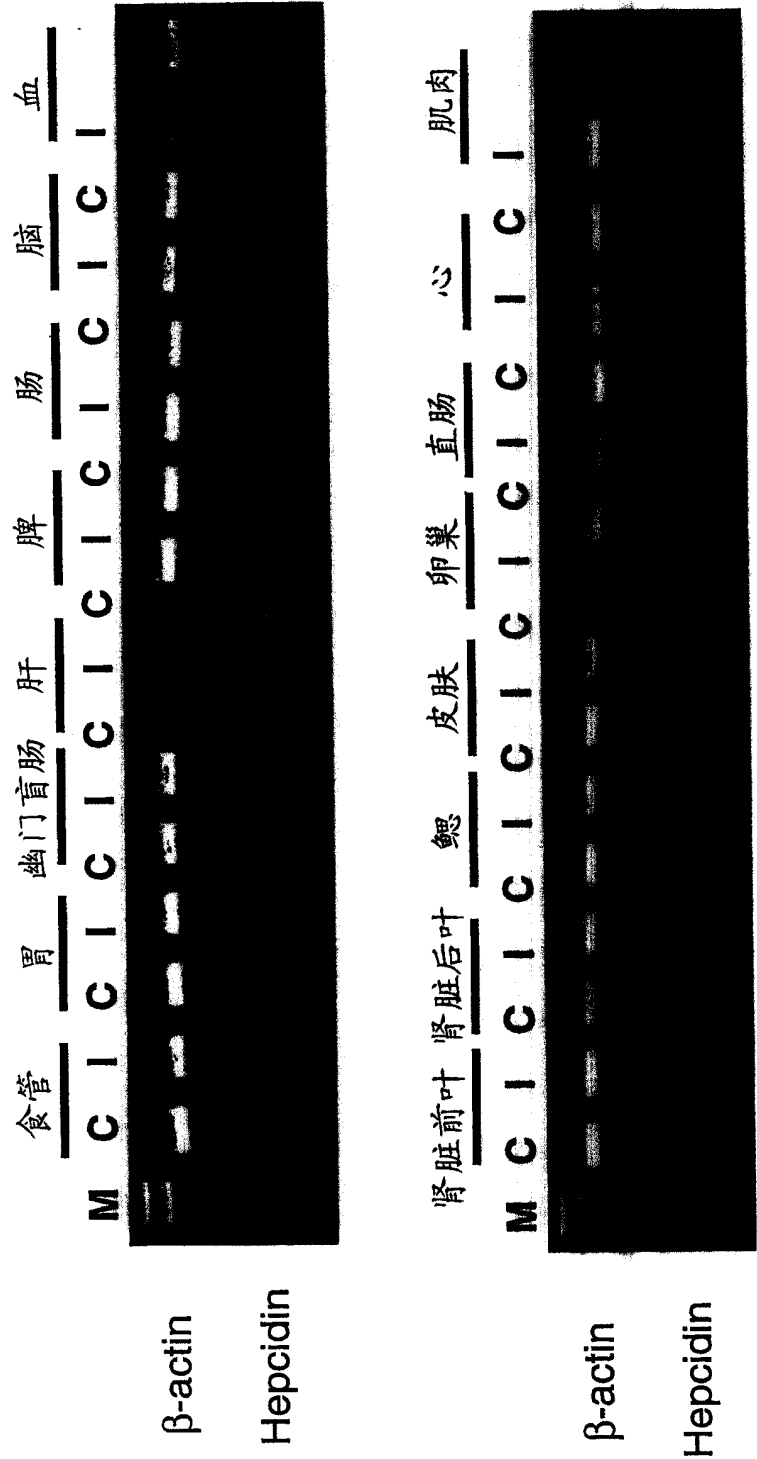


图 21b

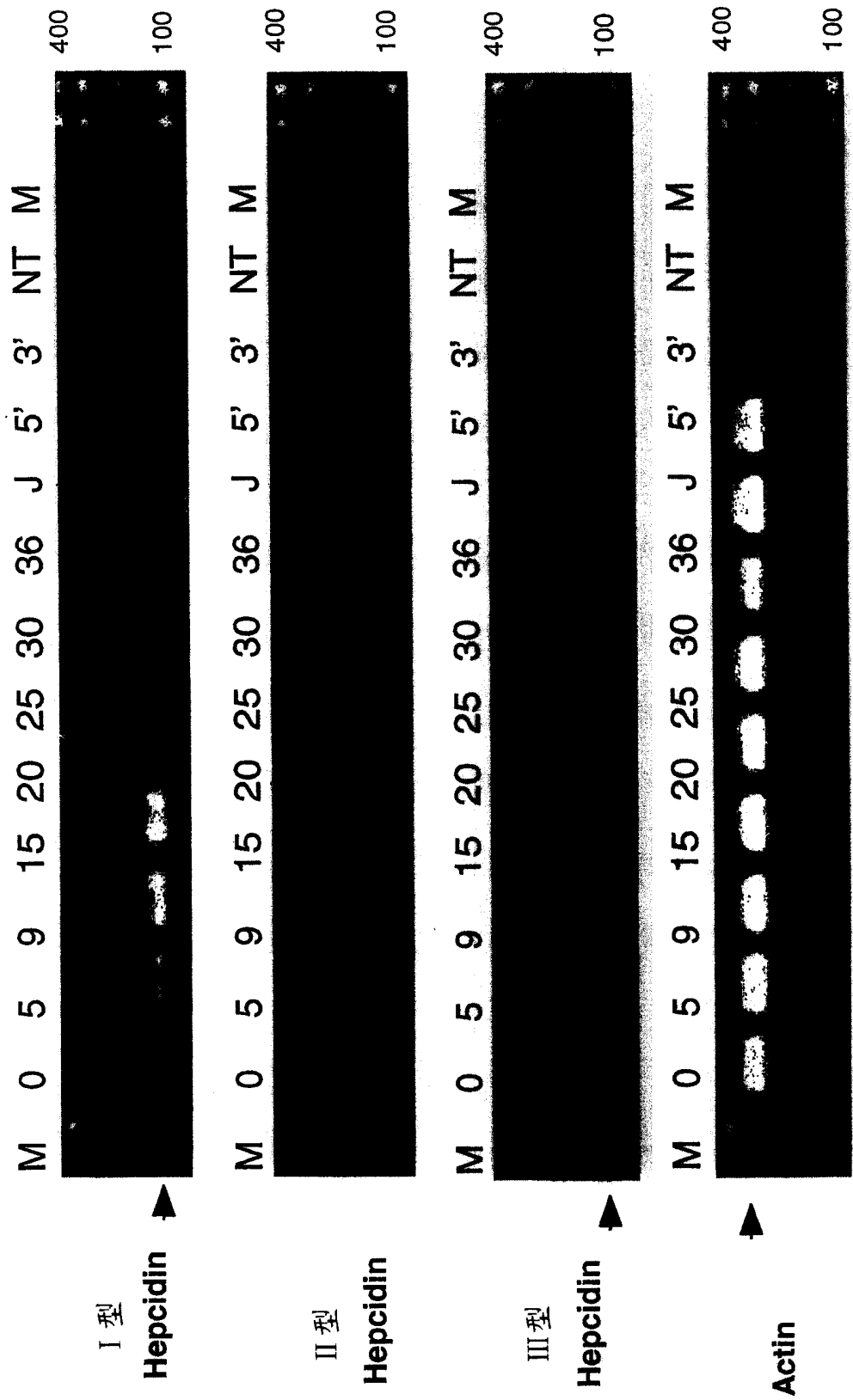
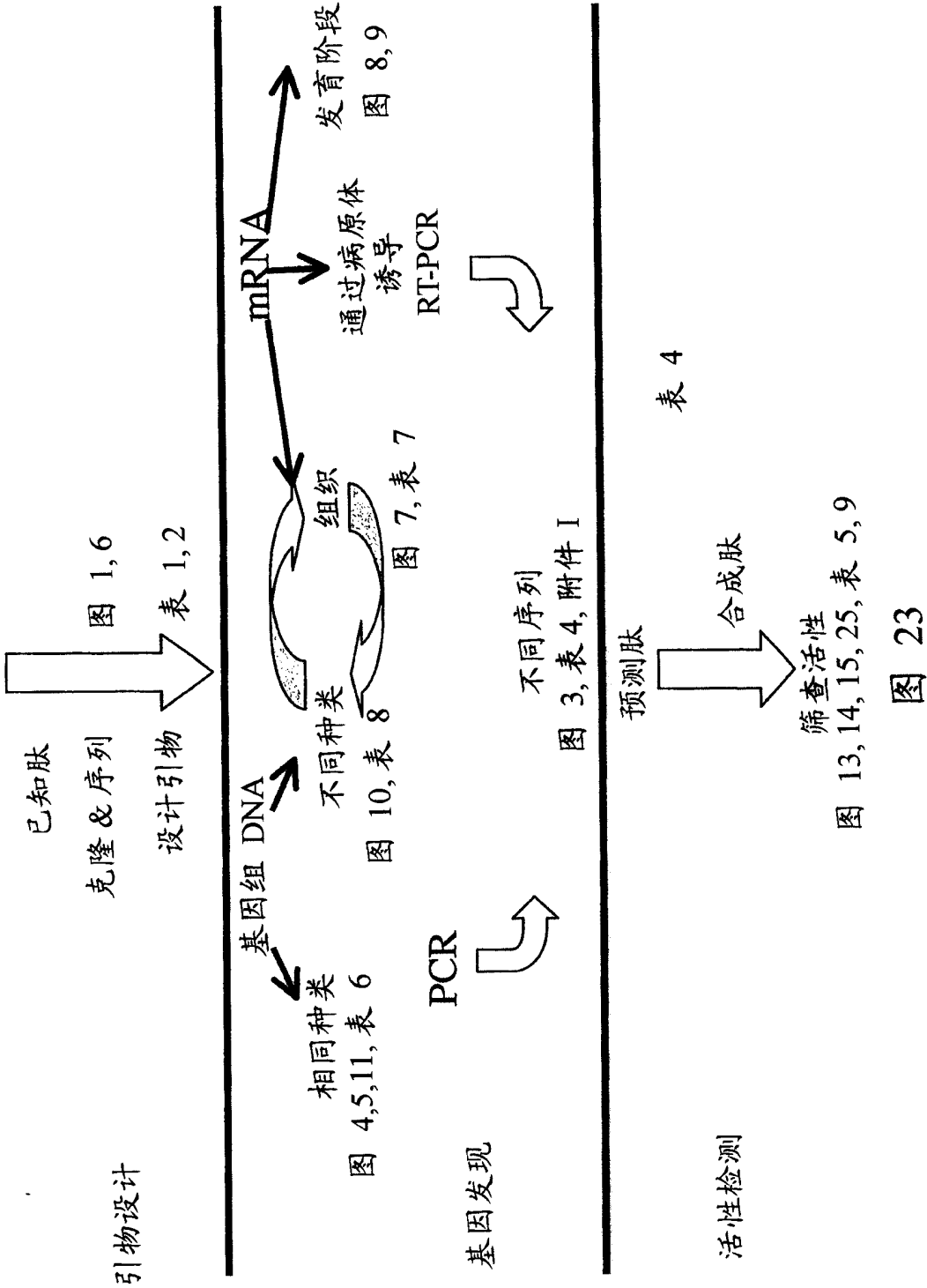
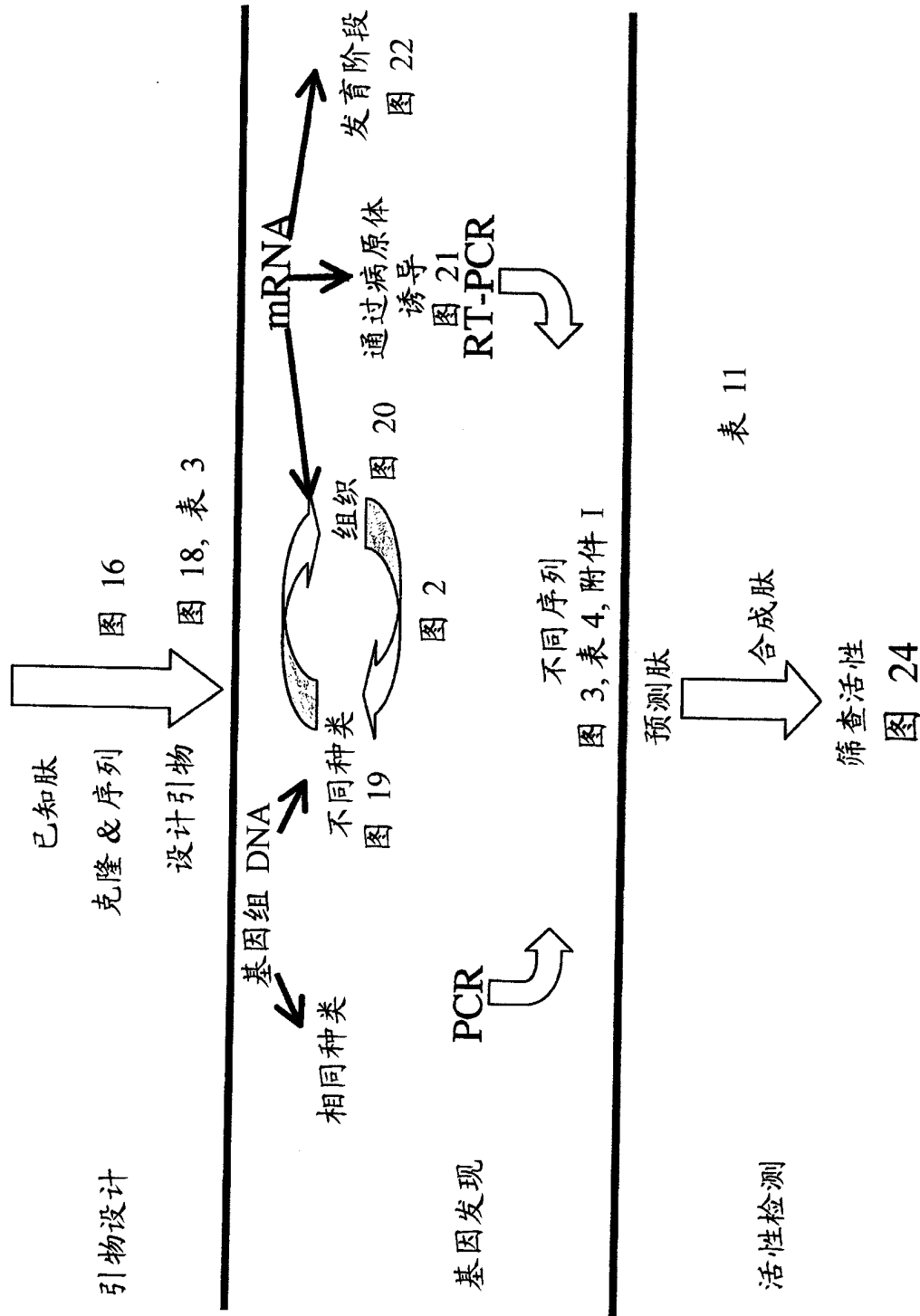


图 22

PLEUROCIDIN 鉴定的流程



PLEUROCIDIN 鉴定的流程



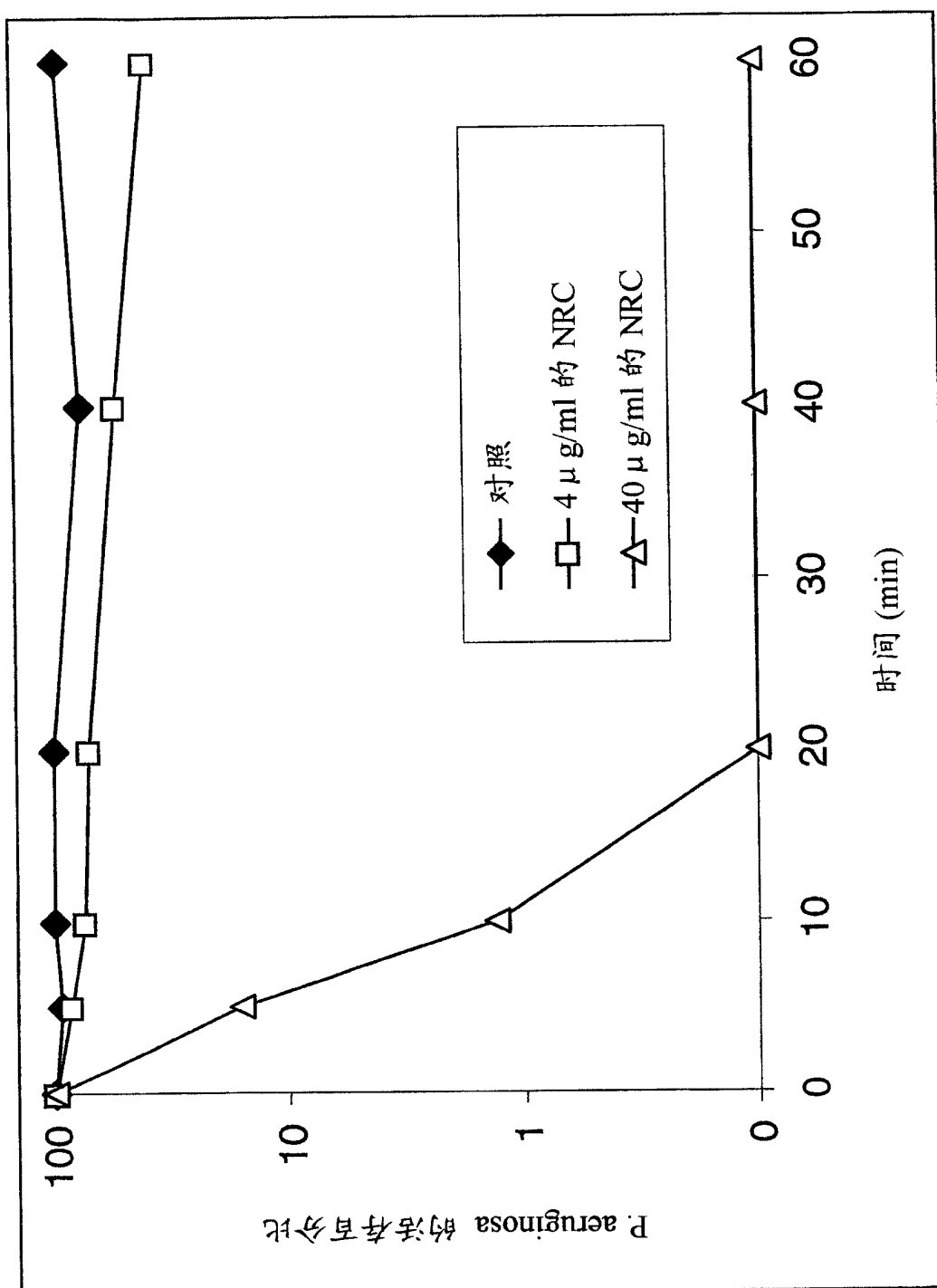


图 25