



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104745708 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201510164657. 6

(22) 申请日 2015. 04. 02

(71) 申请人 湖南省食品安全生产工程技术研究中心

地址 410013 湖南省长沙市岳麓区银双路318号

(72) 发明人 杨丽霞 彭新凯

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

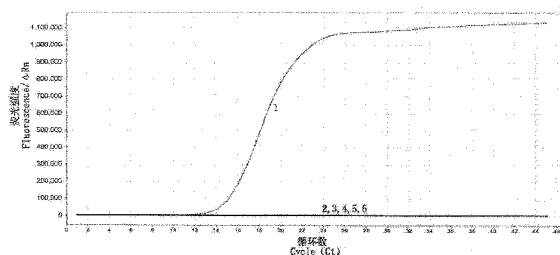
权利要求书2页 说明书5页  
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种转基因玉米NK603品系的LAMP检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种转基因玉米NK603品系的LAMP检测试剂盒,所述LAMP试剂盒中含有SEQ ID NO :1-6的扩增引物,还包括甜菜碱、dNTP、Bst DNA聚合酶缓冲液、荧光染料SYTO-9、Bst DNA聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、阳性对照、阴性对照。采用本发明试剂盒进行环介导等温扩增,扩增产物与反应液中的荧光染料SYTO-9结合,反应结束后采用实时荧光图来判断扩增结果。本发明试剂盒特异性好,灵敏度高,可检出混合样品中低至0.1%含量的NK603,适用于基础实验室进行快速、准确的检测。



1. 一种转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在于,其反应体系中包括甜菜碱、dNTP、Bst DNA 聚合酶缓冲液、荧光染料 SYTO-9、BstDNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、阳性对照、阴性对照以及引物组,其碱基序列如下:

外引物 F3 :5' -GACCAGGTAATCTTACCTTTGT-3'

外引物 B3 :5' -TGAAACCGCTTTC AAGAGAA-3'

内引物 FIP :5' -GGCCGCGTTAACAAGCTTACTTTTTGGACTATCCCGACTCTCT-3'

内引物 BIP :5' -CTTGGTACCACGCGACACATTTTCTGTTATGGTTCGAGAAGAGAT-3'

环引物 LF :5' -TCGAGGTCATTCATATGCTTGA-3'

环引物 LB :5' -AGTGTGGAGTGGATCCTGTT-3'。

2. 如权利要求 1 所述转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:所述的反应体系中甜菜碱浓度为 0.3-1.5mM、dNTP 浓度为 0.2-3.5mM、Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2-18mM。

3. 如权利要求 1 所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:所述反应体系中所述的内引物和外引物的浓度之比为 1-8 : 1;环引物和外引物浓度之比为 1-2 : 1。

4. 如权利要求 3 所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:所述反应体系含有 0.2 μM 外引物、1.6 μM 内引物、0.4 μM 环引物。

5. 如权利要求 1 至 4 任一所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:Bst DNA 聚合酶含量为 4-10U。

6. 如权利要求 5 所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:Bst DNA 聚合酶含量为 8U。

7. 如权利要求 1 所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:所述的阳性对照为转基因玉米 NK603 品系的基因组 DNA。

8. 如权利要求 1 所述的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,其特征在於:所述的阳性对照为含有 NK603 品系耐除草剂基因 CP4EPSPS 基因的重组质粒。

9. 如权利要求 8 所述转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒,所述的阳性对照重组质粒制备方法如下所述:提取转基因玉米 NK603 品系基因组 DNA,利用引物 F3/B3 进行 PCR,扩增并回收 CP4EPSPS 基因并克隆到载体质粒中,转化大肠杆菌感受态细胞,提取质粒, DNA 测序确认序列正确的质粒。

10. 一种应用权利要求 1 所述 LAMP 检测试剂盒检测转基因玉米 NK603 品系的检测方法,包括以下主要步骤:

(1) 提取待检测样品基因组 DNA,以样品基因组 DNA 为模板;

(2) 按照检测样品数目,按照每样品 25 微升反应体系准备 LAMP 扩增反应液:取 2×LAMP reaction mixture 12.5 μL,其中包括 40mmol/L Tris-HCl pH 8.8,20mmol/L KCl,16mmol/L MgSO<sub>4</sub>,20mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.2% Tween-20,0.8mol/L Betaine,2.8mmol/L of dNTPs;加入 10 μmol/L 的外引物 F3 溶液 0.5 μL、10 μmol/L 的外引物 B3 溶液 0.5 μL;加入 20 μmol/L 的内引物 FIP 溶液 2 μL、20 μmol/L 的内引物 BIP 溶液 2 μL;加入 5 μmol/L 的环引物 LF 溶液 2 μL、5 μmol/L 的环引物 LB 溶液 2 μL;加入荧光染料 SYTO-9 0.5 μL、8U/μL Bst DNA 聚合酶 1 μL、混匀;

(3) 加入待检测样本 DNA 模板 2 μL,混匀反应体系;

(4) 等温扩增 :在 PCR 管内壁加 20  $\mu$  L 密封液,63 $^{\circ}$ C 恒温反应 45min,反应结束后,与阳性对照显示荧光相比较 ;

(5) 结果判读 :反应结束后采用实时荧光图来判断扩增结果,反应中使用的染料为荧光染料 SYTO-9。所述的判定结果是根据荧光染料 SYTO-9 形成的扩增曲线作为检出转基因玉米品系 NK603 的结论,反之,结果为未检出转基因玉米品系 NK603。

## 一种转基因玉米NK603品系的LAMP检测试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及转基因玉米品系的检测领域,具体涉及一种转基因玉米NK603品系的LAMP试剂盒和检测方法。

### 背景技术

[0002] 转基因作物或基因修饰作物是通过导入外源基因并整合到基因组中,使某一或某些性状得到改良的作物。转基因作物在提高抗性及改良品质上起到重要的作用。但是由于转基因技术可能产生新毒素和过敏原、导致抗性基因的基因漂移等原因,国际社会对转基因食品的安全性仍有相当大的争议。欧盟、美国、日本等国家都相继颁布了相关法令,对转基因作物及其衍生食品进行标识管理,并对阈值作了相关规定。我国卫生部也于2002年出台了《转基因食品卫生管理办法》。该《办法》规定:对“以转基因动植物、微生物或者其直接加工品为原料生产的食品 and 食品添加剂”必须进行标识。因此建立一套方便、快捷的转基因产品检测技术是贯彻标识制度的重要前提。

[0003] 转基因玉米NK603品系是由美国孟山都公司(Monsanto Company)研制开发,将耐除草剂基因CP4 EPSPS导入玉米中,这一基因编码的CP4 EPSPS蛋白,可以使玉米抗草铵膦。目前该转基因玉米虽已经欧盟正式批准用于食品和饲料,但其安全性仍然备受关注。

[0004] 目前对转基因产品的检测主要是基于核酸水平的PCR检测,包括多重PCR(Multiplex PCR)、实时定量PCR(Real-time PCR)等,但是这些方法需要具有实时荧光检测功能的热循环设备,存在操作步骤繁琐,检测时间较长,不适合于现场实时检测以及跟踪检测。2000年,日本学者Notomi等开发了一种新颖的恒温核酸扩增方法——环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),该方法针对靶基因的6个区域设计4种特异引物,提高了检测的特异性,同时其扩增效率较普通PCR高,很大程度地提高了灵敏度,LAMP技术具有简单、快速、特异性强等优点,已用于致病菌、病毒、寄生虫、过敏原、物种鉴定等检测中。

[0005] 随着越来越多的转基因产品大规模商业化生产,转基因组分的快速检测受到广泛关注,LAMP扩增技术为恒温扩增,可不依赖热循环仪,普通恒温仪器既可以进行检测。因此快速简便的LAMP已成功应用于转基因大豆、棉花、玉米、水稻等作物的检测。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种转基因玉米NK603品系的LAMP检测试剂盒及检测方法。

[0007] 一种转基因玉米NK603品系的LAMP检测试剂盒,其反应体系中包括:甜菜碱、dNTP、Bst DNA聚合酶缓冲液、荧光染料SYTO-9、Bst DNA聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、阳性对照、阴性对照;其特征在于,还包含下述引物,所述引物的碱基序列如下所示:

[0008] 外引物F3:5' -GACCAGGTAATCTTACCTTTGT-3'

[0009] 外引物B3:5' -TGAAACCGCTTCAAGAGAA-3'

[0010] 内引物 FIP :5' -GGCCGCGTTAACAAGCTTACTTTTTGGACTATCCCAGACTCTCT-3'

[0011] 内引物 BIP :5' -CTTGGTACCACGCGACACATTTTCTGTTATGGTTCGAGAAGAGAT-3'

[0012] 环引物 LF :5' -TCGAGGTCATTCATATGCTTGA-3'

[0013] 环引物 LB :5' -AGTGTTTGAGTGGATCCTGTT-3'。

[0014] 优选地,所述的反应体系中甜菜碱浓度为 0.3-1.5mM、dNTP 浓度为 0.2-3.5mM、Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2-18mM。

[0015] 优选地,所述反应体系中所述的内引物和外引物的浓度之比为 1-8 : 1 ;环引物和外引物浓度之比为 1-2 : 1。

[0016] 优选地,所述反应体系含有 0.2 μ M 外引物、1.6 μ M 内引物、0.4 μ M 环引物。

[0017] 优选地,Bst DNA 聚合酶含量为 4-10U,更优选地,Bst DNA 聚合酶含量为 8U。

[0018] 优选地,其特征在于所述的阳性对照为转基因玉米 NK603 品系的基因组 DNA。

[0019] 优选地,所述的阳性对照为含有 NK603 品系耐除草剂基因 CP4EPSPS 基因的重组质粒。

[0020] 所述的阳性对照重组质粒制备方法如下所述:提取转基因玉米 NK603 品系基因组 DNA,利用引物 F3/B3 进行 PCR,扩增并回收 CP4EPSPS 基因并克隆到载体质粒中,转化大肠杆菌感受态细胞,提取质粒,DNA 测序确认序列正确的质粒。

[0021] 本发明还提供了一种应用 LAMP 检测试剂盒检测转基因玉米 NK603 品系的检测方法,包括以下主要步骤:

[0022] (1) 提取待检测样品基因组 DNA,以样品基因组 DNA 为模板;

[0023] (2) 按照检测样品数目,按照每样品 25 微升反应体系准备 LAMP 扩增反应液:取 2×LAMP reaction mixture 12.5 μ L,其中包括 40mmol/L Tris-HCl pH 8.8,20mmol/L KCl,16mmol/L MgSO<sub>4</sub>,20mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.2 % Tween-20,0.8mol/L Betaine,2.8mmol/L of dNTPs;加入 10 μ mol/L 的外引物 F3 溶液 0.5 μ L、10 μ mol/L 的外引物 B3 溶液 0.5 μ L;加入 20 μ mol/L 的内引物 FIP 溶液 2 μ L、20 μ mol/L 的内引物 BIP 溶液 2 μ L;加入 5 μ mol/L 的环引物 LF 溶液 2 μ L、5 μ mol/L 的环引物 LB 溶液 2 μ L;加入荧光染料 SYTO-9 0.5 μ L、8U/μ L Bst DNA 聚合酶 1 μ L、混匀;

[0024] (3) 加入待检测样本 DNA 模板 2 μ L,混匀反应体系;

[0025] (4) 等温扩增:在 PCR 管内壁加 20 μ L 密封液;63℃恒温反应 45min,反应结束后,与阳性对照显示荧光相比较;

[0026] (5) 结果判读:反应结束后采用实时荧光图来判断扩增结果,反应中使用的染料为荧光染料 SYTO-9。所述的判定结果是根据荧光染料 SYTO-9 形成的扩增曲线作为检出转基因玉米品系 NK603 的结论,反之,结果为未检出转基因玉米品系 NK603。

[0027] 本发明提供了一种闭管荧光检测体系,本发明根据 LAMP 技术原理,将该方法与实时荧光技术相结合,在 LAMP 反应体系中,加入荧光染料,扩增结束后,扩增得到的 DNA 与荧光染料相结合,不需要电泳,在肉眼或荧光检测仪上即可方便观察扩增结果,该实时荧光 LAMP 快速检测方法,适合在基层检测单位及现场快检工作中的推广使用。

[0028] 本发明的有益效果为:本发明研制的转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒和检测方法,适用于转基因玉米 NK603 品系的检测,特异性好,检测灵敏度高(0.1%样品可检出),方法快速准确,尤其适用于基层一线实验室和现场检测的推广和应用。

### 附图说明

[0029] 图 1 :转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测方法特异性实验结果图 (1-6 分别是转基因玉米 NK603、MON863、MON810、转基因水稻 Bt63、转基因玉米混合样品 (含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176), 阴性对照)。

[0030] 图 2 :转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测方法灵敏度实验结果图 (1-7 分别是 5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0% 的转基因玉米, 阴性对照)。

### 具体实施方式

[0031] 本发明中转基因玉米标准品 NK603、MON863、MON810 购自国家标准物质信息中心, 转基因水稻 Bt63 和转基因玉米混合样品 (含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176) 由湖南省出入境检验检疫局馈赠, 非转基因玉米样品购自市场。

[0032] 实施例 1 :LAMP 引物组的设计

[0033] 根据转基因玉米 NK603 品系特异性基因序列 (GenBank 序列号 AX342369), 设计 LAMP 引物组, LAMP 引物组由外引物 F3、外引物 B3、内引物 FIP、内引物 BIP、环引物 LF、环引物 LB 组成, 各引物的具体序列见表 1。

[0034] 表 1 LAMP 引物序列

[0035]

引物名称	类型	碱基数	序列 (5' → 3')	SEQ. ID
F3	正向外引物	22	GACCAGGTAATCTTACCTTTGT	1
B3	反向外引物	20	TGAAACCGCTTTCAAGAGAA	2
FIP	正向内引物	43	GGCCGCGTTAACAAGCTTACTTTTTGG ACTATCCCGACTCTCT	3
BIP	反向内引物	45	CTTGGTACCACGCGACACATTTTCTGT TATGGTTCGAGAAGAGAT	4
LF	正向环引物	22	TCGAGGTCATTCATATGCTTGA	5
LB	反向环引物	21	AGTGTTTGAGTGGATCCTGTT	6

[0036] 上述引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。分别配制成浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的外引物 F3 溶液、10  $\mu\text{mol/L}$  的外引物 B3 溶液、20  $\mu\text{mol/L}$  的内引物 FIP 溶液、20  $\mu\text{mol/L}$  的内引物 BIP 溶液、5  $\mu\text{mol/L}$  的环引物 LF 溶液、5  $\mu\text{mol/L}$  的环引物 LB 溶液作为试剂盒, 备用。

[0037] 实施例 2 :阳性对照重组质粒 T-NK 的制备

[0038] 按照 CTAB 法提取转基因玉米 NK603 品系基因组 DNA, 利用正向外引物 F3、反向外引物 B3 进行 PCR, 扩增目的条带, 反应条件如下:

[0039] PCR 反应体系 (50  $\mu\text{L}$ ): 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ 、5U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  的引物 NK603-F3/NK603-B3 分别 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu\text{L}$ 、基因组 DNA 5  $\mu\text{L}$ ; 置于 PCR 扩增仪进行反应, 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  4min 预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30sec、58 $^{\circ}\text{C}$  退火 30sec、72 $^{\circ}\text{C}$  延伸

30sec,共 30 个循环 ;72℃延伸 5min。

[0040] 回收目的条带,与载体 pMD18-T 连接,转化 DH5  $\alpha$  感受态细胞,提取质粒,PCR 鉴定阳性后送去上海生工生物工程有限公司测序。序列正确的质粒标记为 T-NK 作为转基因玉米 NK603 品系的阳性对照。

[0041] 重组质粒的制备,不仅限于本实施例中的 pMD18-T 载体,任何常规分子克隆常用载体、大肠杆菌均可以用来制备阳性对照质粒。

[0042] 转基因玉米 NK603 品系基因组 DNA 也可以作为本发明中的阳性对照使用。

[0043] 实施例 3 :等温扩增的反应体系和反应条件优化

[0044] 本发明中,样品基因组 DNA 由常规 CTAB 法提取,用于进行等温扩增反应。在实验中,我们对等温扩增的引物配比进行了优化,在甜菜碱浓度为 0.3-1.5mM、dNTP 浓度为 0.2-3.5mM、Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2-18mM。所述的内引物和外引物的浓度之比为 1-8 : 1 ;环引物和外引物浓度之比为 1-2 : 1,均可以有效扩增检测出 NK603 品系样品。最佳实施例如下 :

[0045] 等温扩增反应体系为 25  $\mu$  L,即在 0.2mL 的 PCR 反应管中加入 :2 $\times$ LAMP reaction mixture(40mmol/L Tris-HCl pH 8.8,20mmol/L KCl,16mmol/L MgSO<sub>4</sub>,20mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.2% Tween-20,0.8mol/L Betaine,2.8mmol/L of dNTPs)12.5  $\mu$  L、10  $\mu$  mol/L 的外引物 F3 溶液 0.5  $\mu$  L、10  $\mu$  mol/L 的外引物 B3 溶液 0.5  $\mu$  L、20  $\mu$  mol/L 的内引物 FIP 溶液 2  $\mu$  L、20  $\mu$  mol/L 的内引物 BIP 溶液 2  $\mu$  L、5  $\mu$  mol/L 的环引物 LF 溶液 2  $\mu$  L、5  $\mu$  mol/L 的环引物 LB 溶液 2  $\mu$  L、荧光染料 SYTO-90.5  $\mu$  L、8U/ $\mu$  L Bst DNA 聚合酶 1  $\mu$  L、重组质粒 T-NK DNA 2  $\mu$  L,混匀后在 PCR 管内壁加 20  $\mu$  L 密封液。等温扩增反应条件为 :63℃恒温反应 45-60min。

[0046] 反应结束后采用实时荧光图来判断扩增结果,反应中使用的染料为荧光染料 SYTO-9。所述的判定结果是根据荧光染料 SYTO-9 形成的扩增曲线作为检出转基因玉米 NK603 品系的结论,反之为未检出转基因玉米 NK603 品系。

[0047] 实施例 4 :制备转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒

[0048] 为方便使用,根据实施例 1、2、3,组装检测试剂盒(50 次),以方便使用。

[0049] A 试液,为 LAMP 反应体系,含有 :2 $\times$ LAMP reaction mixture、荧光染料 SYTO-9、Bst DNA 聚合酶、LAMP 检测引物组 ;每剂 A 试液含有 2 $\times$ LAMP reaction mixture 625  $\mu$  L、荧光染料 SYTO-9 25  $\mu$  L、8U/ $\mu$  L Bst DNA 聚合酶 50  $\mu$  L、LAMP 引物组 450  $\mu$  L,其中外引物 F3 和 B3 溶液各 25  $\mu$  L ;内引物 FIP 和 BIP 溶液各 100  $\mu$  L ;环引物 LF 和 LB 溶液各 100  $\mu$  L ;引物 F3、B3、FIP、BIP、LF、LB 分别具有序列 SEQ. ID. No. 1 至 SEQ. ID. No. 6 的碱基序列。

[0050] B 试液为重组质粒 T-NK603 100  $\mu$  L,浓度为 0.1ng/ $\mu$  L,作为阳性对照 ;

[0051] C 试液为去离子水 100  $\mu$  L,作为阴性对照。

[0052] 实施例 5 :转基因玉米 NK603 品系检测的 LAMP 试剂盒的特异性实验

[0053] 取转基因玉米 NK603、MON863、MON810、转基因水稻 Bt63 和转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176) 分别 1 份,按 CTAB 方法分别提取基因组 DNA,并进行 LAMP 等温扩增,用于确定试剂盒的特异性。

[0054] 图 1 是应用本发明的引物组和检测方法检测转基因玉米 NK603 品系和其他 5 种样品的实验结果图,1-6 分别是转基因玉米 NK603、MON863、MON810、转基因水稻 Bt63、转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176)、阴性对照,根据实时荧光图来判断

扩增结果,仅转基因玉米 NK603 基因组有扩增曲线。

[0055] 从图 1 的结果可以看出,其他转基因玉米品系、其他植物和非转基因玉米均没有发生特异性扩增。实验结果表明建立的 LAMP 方法具有良好的特异性,可用于转基因玉米 NK603 品系的检测。

[0056] 实施例 6 :转基因玉米 NK603 品系检测的 LAMP 试剂盒的灵敏度实验

[0057] 将转基因玉米 NK603 品系标准品与非转基因玉米样品混合,配制成转基因玉米 NK603 品系相对百分含量 (w/w) 为 5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0% 的玉米种子样品,CTAB 法分别提取基因组 DNA,按照实施例 3 最佳实施例进行等温扩增。

[0058] 图 2 是本发明转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测方法灵敏度实验结果图,1-7 分别是 5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0% 的转基因玉米、阴性对照玉米样品的 LAMP 检测结果。

[0059] 实验结果显示 :转基因玉米 NK603 含量为 5%、1%、0.5%、0.1% 的样品均有扩增曲线出现,说明建立的 LAMP 方法可从转基因玉米 NK603 品系含量为 0.1% 的样品中成功检测出转基因玉米 NK603,具有较高的灵敏度,可用于含转基因玉米 NK603 品系样品的检测。

[0060] 以上具体实施方式仅为本创作的较佳实施例,并不用以限制本创作,凡在本创作的精神及原则之内所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本创作的保护范围之内。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 湖南省食品安全生产工程技术研究中心

&lt;120&gt; 一种转基因玉米 NK603 品系的 LAMP 检测试剂盒及检测方法

&lt;130&gt; 001

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 1

gaccaggtaa tcttaccttt gt

22

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 2

tgaaaccgct ttcaagagaa

20

[0002]

<210> 3

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<400> 3

ggccgcgtta acaagcttac ttttggact atcccgactc tct

43

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<400> 4

cttggtagca cgcgacacat tttctgttat ggttcgagaa gagat

45

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<400> 5

[0003]

---

tcgaggtcat tcatatgctt ga

22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<400> 6

agtgtttgag tggatcctgt t

21

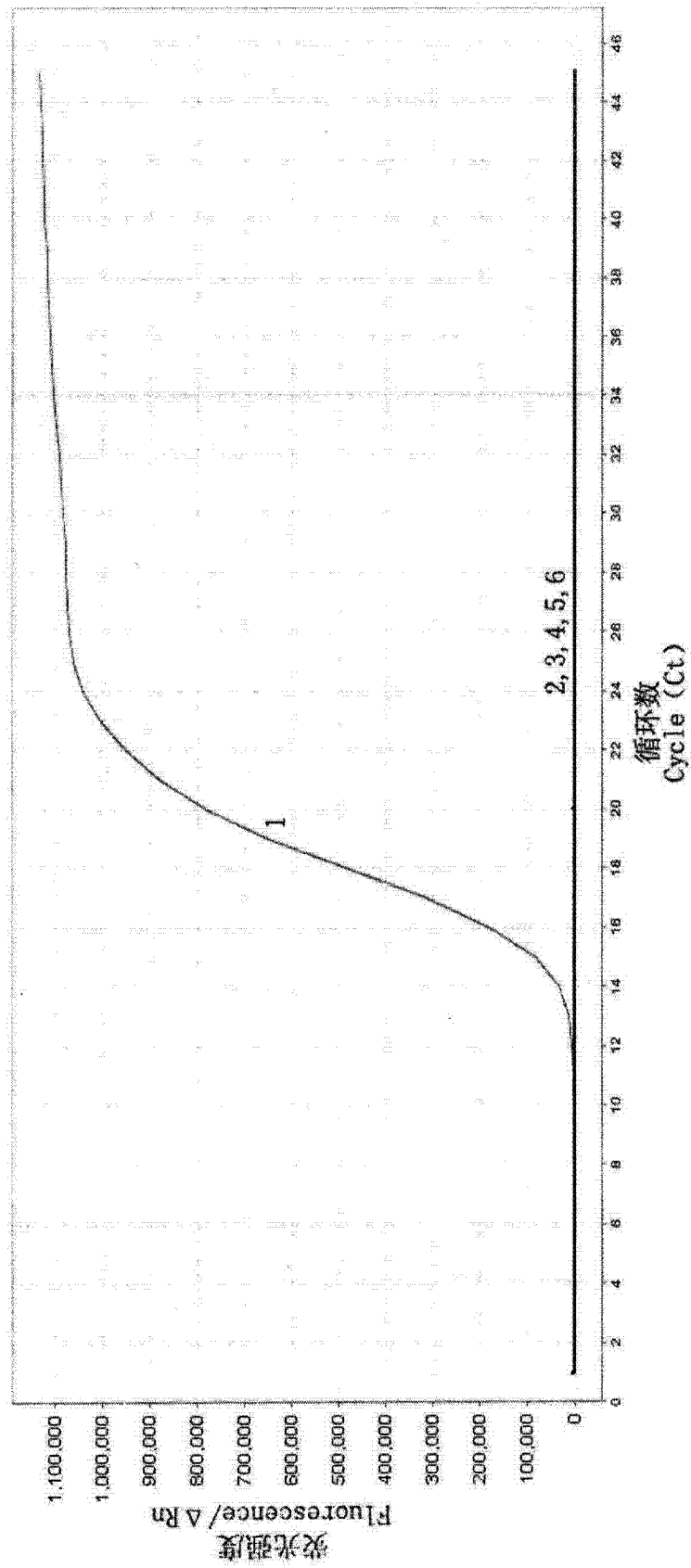


图 1

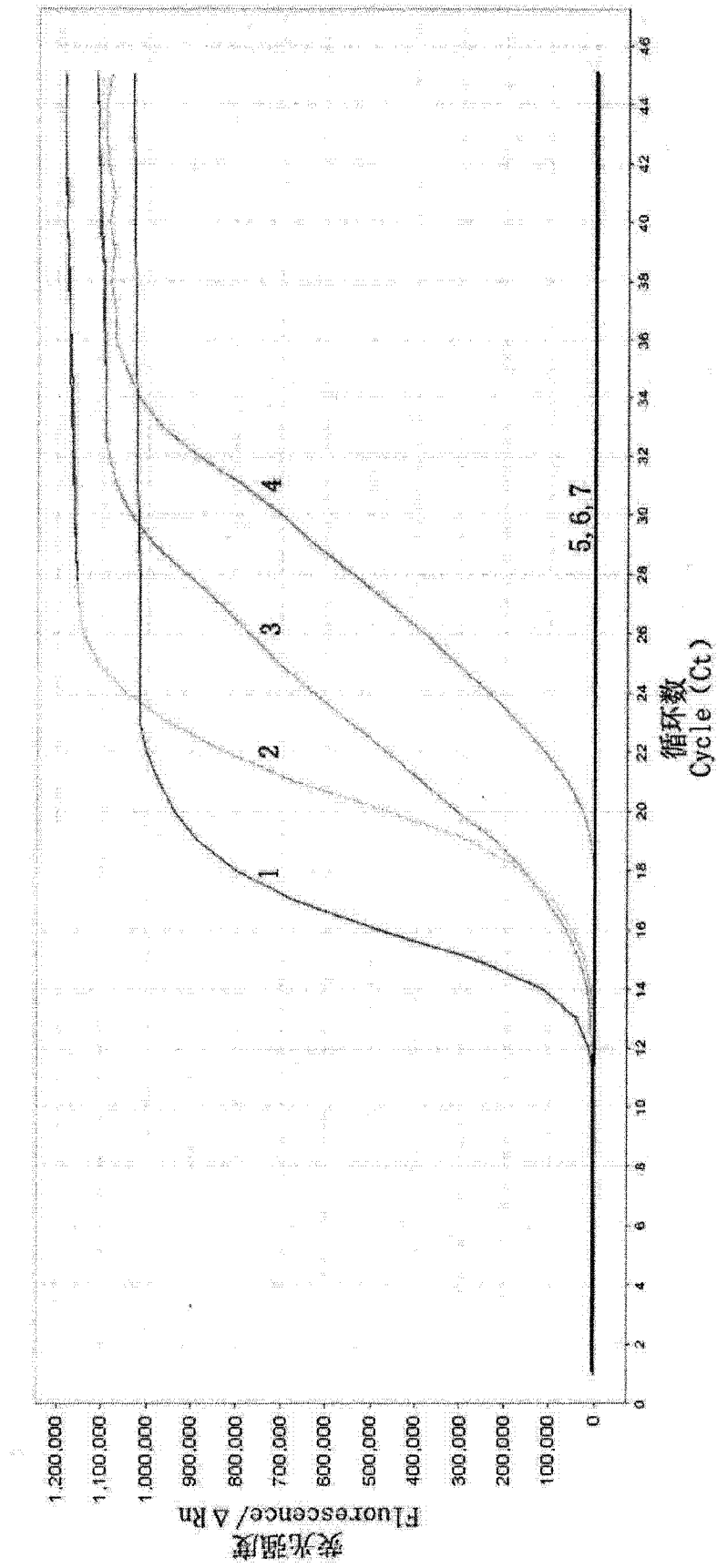


图 2