

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610052234.6

[43] 公开日 2007年1月24日

[11] 公开号 CN 1900315A

[22] 申请日 2006.6.30

[21] 申请号 200610052234.6

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市江干区凯旋路 268  
号应用生物科学系

[72] 发明人 汪志平 杨灵勇 陈晓燕 李雪斌

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司  
代理人 陈祯祥

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

### [54] 发明名称

一种筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法

### [57] 摘要

一种筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法。通过设计 16S - 23S rRNA 转录间隔区的引物,应用 PCR 技术克隆并测定 7 株钝顶螺旋藻品系 Sp - 1、Sp - 2、Sp - 3、Sp - 5、Sp - 9、Sp - 10 和 Sp - 15 的 16S - 23S rRNAITS 序列 SEQ NO1。依据各序列的相似程度,将 7 株品系中 Sp - 3、Sp - 5 和 Sp - 15 分一类; Sp - 1、Sp - 2、Sp - 9 和 Sp - 10 分为另一类;再将候选品系的 16S - 23SrRNAITS 序列进行比对,若与 Sp - 3、Sp - 5、Sp - 15 聚成一类,则性状优良,适合大规模生产;若与 Sp - 1、Sp - 2、Sp - 9、Sp - 10 聚成一类则不可应用于生产开发。

1、一种筛选优质螺旋藻品系的方法，其特征是7株钝顶螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-5、Sp-9、Sp-10、Sp-15 具有 SEQNO1 的 16S-23S rRNA ITS 序列；将候选品系的 16S-23S rRNA ITS 序列与上述品系序列多重比对，筛选优质螺旋藻品系。

2、按权利要求1所述筛选优质螺旋藻品系的方法，其特征是采用下列操作步骤：

(1) 选用材料为7株钝顶节螺旋藻品系，即 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-5、Sp-9、Sp-10 和 Sp-15 其中，Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 对环境适应能力强，在大规模生产养殖中被广泛应用，而 Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 因适应能力差而不能用作生产良种；

(2) 试剂和仪器：*Taq* DNA 聚合酶和琼脂糖为上海生工生物工程公司产品；克隆载体 pMD18-T，以及 dNTP、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均为日本 TaKaRa 公司产品；DNA 凝胶回收试剂盒购于上海英骏公司；PCR 引物由上海英骏公司合成，其它试剂均为分析纯，序列扩增用美国 Hybaid 公司的 Thermal Cycler PCR 仪，测序用美国 ABI 公司的 3730 型测序仪；

(3) PCR 引物设计与扩增

利用 Primer 5.0 引物设计软件得到上游引物 SF：5' -TTAGGGAGACCTAC TTCAGGACA-3'，下游引物 SR：5' -TACATTGGAATTGTCTTTACGA-3'，25 $\mu$ L PCR 反应体系中含引物 PF 和 PR 各 0.5 $\mu$ mol/L，4 种 dNTP 各 1 $\mu$ mol/L，2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶，10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 $\mu$ L，100ng 基因组 DNA，反应程序：94 $^{\circ}$ C 5min；94 $^{\circ}$ C 30s，55 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 5min；

(4) PCR 产物的克隆及测序

将经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上，转化感受态 *E. coli* TG1，蓝白斑法筛选阳性克隆，提取质粒并作酶切鉴定，将含有目的片段的重组质粒进行测序，如表 SEQNO1 及表 SEQNO2 的 16S-23S rRNA ITS 序列所示；

(5) 序列比对与系统发生树构建

多重序列比对采用 Clustal X 1.81 软件，系统发生树的构建采用 Phylip 3.65 软件包，经过比对，如果被筛选的钝顶螺旋藻品系能与 Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 三株聚成一类，则该品系性能优良，适合大规模生产养殖。

## 一种筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法

### 技术领域

本发明属于螺旋藻开发应用的技术

### 背景技术

螺旋藻 (*Spirulina*), 是一种光合放氧、呈规则螺旋形的原核丝状微藻, 系蓝藻门 (Cyanophyta)、颤藻目 (Oscillatoriales)、颤藻科 (Oscillatoriaceae) 的一个属[武汉植物学研究, 1997, 15(4): 369-374], 因其富含优质蛋白和多种生物活性物质而受到国内外的极大关注, 目前已在大量研究的基础上形成了庞大的螺旋藻产业, 并应用于食品、生物医药保健、饲料、精细化工等领域。该属中的钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 是国内外在商业化养殖生产与开发中应用最广泛的品种。值得指出的是, 众多的实验研究与长期的生产实践表明, 钝顶螺旋藻种下有许多品系, 它们对温度、光质、光照强度, 以及培养液的盐度、pH 和营养成分等环境因子的要求与适应性存有显著差异[水生生物学报, 1999, 23(1): 59-64]。目前国内外几乎都采用开放或半封闭、跑道型循环式培养池这一较粗放的养殖生产模式, 许多环境因子, 特别是温度和光照强度, 难以人为调控, 有些钝顶螺旋藻品系在实验室或生产小试中虽然表现出优良的生产性能, 但进入生产池后, 因难以适应环境因子的较大变化而无法应用于大规模生产。因此, 选育品性兼优的品系一直是螺旋藻养殖生产与开发中最重要的环节与技术要点之一。

目前国内外适筛选合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法是, 先在实验室作多种环境因子交叉组合培养试验, 根据所测定的生长曲线、光合放氧、生化组成等指标作初步筛选; 再依次转接到室外约 5 m<sup>2</sup>、50 m<sup>2</sup> 及 500 m<sup>2</sup> 的培养池中于不同季节与气候及营养条件下进行养殖小试、中试与生产性试验, 进而筛选出优良藻株。这一方法虽然实用, 但程序繁琐、工作量大、周期长、成本高。因此, 迫切需要建立既实用, 又简便、耗时少、低成本的优质螺旋藻品系的筛选新方法, 以满足当前国内外螺旋藻产业不断发展的实际需要。

### 发明内容

本发明目的是提供一种适合大规模生产的筛选优质螺旋藻品系的新方法。

16S-23S rRNA 转录间隔区 (Internally Transcribed Spacer, ITS) 是存在于所有生物基因组中的一类古老的序列。我们通过设计其特定的引物, 利用 PCR 等分子生物学方法克隆并测定了 7 株钝顶螺旋藻品系 Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-5、Sp-9、Sp-10 和 Sp-15 的 16S-23S rRNA ITS

序列,进而利用生物信息学及分子系统学等分析显示,这7株品系的16S-23S rRNA ITS序列不尽相同,依据16S-23S rRNA ITS序列的相似程度,7株品系可以分为两大类:其中Sp-3、Sp-5和Sp-15为一类;Sp-1、Sp-2、Sp-9和Sp-10为另一类。长期的实验研究与实践表明,上述7株钝顶螺旋藻品系在温度、光照等环境因子能自动调控的实验室培养试验中均表现优良,但只有Sp-3、Sp-5和Sp-15这3株品系在实际生产养殖中也表现优良,而Sp-1、Sp-2、Sp-9和Sp-10因适应能力差而不能用作生产良种。由此可见,16S-23S rRNA ITS序列特征与螺旋藻生产性状存在相关性,因此,16S-23S rRNA ITS序列有望作为筛选优质螺旋藻品系的分子标记,即候选品系的16S-23S rRNA ITS序列若与Sp-3、Sp-5、Sp-15的聚成一类,则可能生产性状优良,适合大规模生产;若与Sp-1、Sp-2、Sp-9、Sp-10的聚成一类,则可能不可应用于生产。

本发明的显著优点:

本发明所建立的筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系的方法与常规方法相比,不仅简单快速、标准明确,而且成本低,并适合大规模、高通量筛选。

#### 附图说明

图1为7株品系的系统发生树示意图;

图2为10株品系的系统发生树示意图。

#### 具体实施方式

本发明的技术方案可以通过以下步骤实现

1、选用材料为公知的7株钝顶节旋藻品系,即Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-5、Sp-9、Sp-10和Sp-15(浙江大学原子核农业科学研究所生物资源与分子工程实验室也有保存)。其中,Sp-3、Sp-5和Sp-15对环境适应能力强,在大规模生产养殖中被广泛应用,而Sp-1、Sp-2、Sp-9和Sp-10因适应能力差而不能用作生产良种;

2、试剂和仪器: *Taq* DNA聚合酶和琼脂糖为上海生工生物工程公司产品;克隆载体pMD18-T,以及dNTP、DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶均为日本TaKaRa公司产品;DNA凝胶回收试剂盒购于上海英骏公司;PCR引物由上海英骏公司合成。其它试剂均为分析纯。序列扩增用美国Hybaid公司的Thermal Cycler PCR仪,测序用美国ABI公司的3730型测序仪;

#### 3、PCR引物设计与扩增

利用Primer 5.0引物设计软件得到上游引物SF: 5' -TTAGGGAGACCTAC TTCAGGACA-3', 下游引物SR: 5' -TACATTGGAATTGTCTTTACGA-3'。25 $\mu$ L PCR

反应体系中含引物 PF 和 PR 各 0.5 $\mu$ mol/L, 4 种 dNTP 各 1 $\mu$ mol/L, 2.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 10 倍的 PCR 缓冲液 2.5 $\mu$ L, 100ng 基因组 DNA[提取方法参考——海洋与湖沼, 2002, 33(2): 203-208]。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min;

#### 4、PCR 产物的克隆及测序

将经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态 *E. coli* TG1, 蓝白斑法筛选阳性克隆, 提取质粒并作酶切鉴定, 将含有目的片段的重组质粒进行测序。

#### 5、序列比对与系统发生树构建

多重序列比对采用 Clustal X 1.81 软件, 系统发生树的构建采用 Phylip 3.65 软件包, 经过比对, 如果被筛选的钝顶螺旋藻品系能与 Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 三株聚成, 则该品系性能优良, 适合大规模生产养殖。

#### 结果与分析

##### 基于16S-23S rRNA ITS序列的差异位点数分析及系统发生树构建

Sp-1、Sp-2、Sp-3、Sp-5、Sp-9、Sp-10 和 Sp-15 的基因组 DNA 分别经 16S-23S rRNA ITS 序列的特定引物 PCR 扩增与克隆, 并测得相应的序列。如 SEQNO1 及 SEQNO2 的 16S-23SrRNA ITS 序列所示;

运用 Clustal X 1.81 软件对 7 株品系的 16S-23S rRNA ITS 序列作多重序列比对分析, 并统计得到品系间碱基的差异位点数。由表 1 可知, Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 两两之间的差异位点数为 0; Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 两两之间的差异位点数也为 0; 然而 Sp-1、Sp-2、Sp-9、Sp-10 这 4 个品系与 Sp-3、Sp-5、Sp-15 两两之间的差异位点数为 46。进一步地, 将上述 7 株品系的 16S-23S rRNA ITS

表 1 7 株品系的 16S-23S rRNA ITS 序列的差异位点数

藻株	Sp-1	Sp-2	Sp-9	Sp-10	Sp-3	Sp-5	Sp-15
Sp-1	0						
Sp-2	0	0					
Sp-9	0	0	0				
Sp-10	0	0	0	0			
Sp-3	46	46	46	46	0		
Sp-5	46	46	46	46	0	0	
Sp-15	46	46	46	46	0	0	0

序列的多重序列比对结果导入 Phylip 3.65 软件包的 dnamlk 程序进行系统发生树构建。结果如图 1 所示，7 株品系可分为两大类：Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 为一类；Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 为一类，这与上述差异位点数分析的结果相吻合。

长期的实验研究表明，上述 7 株钝顶螺旋藻品系在温度、光照等环境因子能自动调控的实验室培养试验中均表现优良，但只有 Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 这 3 株品系在实际生产养殖中运用得比较广泛，而 Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 因适应能力差而不能用作生产良种。由此可见，16S-23S rRNA ITS 序列特征与螺旋藻生产性状存在相关性，因此，16S-23S rRNA ITS 序列可以作为筛选优质螺旋藻品系的分子标记，即候选品系的 16S-23S rRNA ITS 序列若与 Sp-3、Sp-5、Sp-15 的聚成一类，则可能生产性状优良；若与 Sp-1、Sp-2、Sp-9、Sp-10 的聚成一类，则可能不可应用于生产。

作为实例，我们选取了 Sp-6、Sp-12 和 Sp-16 这 3 株品系来验证本发明的实用性，其中，Sp-12 和 Sp-16 这两个品系是适用于大规模生产养殖的良种，而 Sp-6 因适应性差而不能用于大规模生产。通过克隆并测定这 3 株品系的 16S-23S rRNA ITS 序列：利用生物信息学及分子系统学等分析表明，如 SEQNO2 和附图 2 所示，Sp-12 和 Sp-16 的 16S-23S rRNA ITS 序列与 Sp-3、Sp-5 和 Sp-15 的聚成一类，且序列完全一致，而 Sp-6 的 16S-23S rRNA ITS 序列与 Sp-1、Sp-2、Sp-9 和 Sp-10 的聚成一类，且序列完全一致。上述结果进一步说明，16S-23S rRNA ITS 序列可以作为一种分子标记来筛选适合大规模生产的优质螺旋藻品系。

#### SEQNO1 7 株螺旋藻品系的 16S-23S rRNA ITS 序列的多重序列比对分析结果

其中 Sp-1、Sp-2、Sp-9、Sp-10 这 4 个品系与 Sp-3、Sp-5、Sp-15 两两之间的差异位点被标下划线；“\*”表示 7 个品系的 16S-23S rRNA ITS 序列的相同位点。

```

Sp-1   1  TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGCATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT
Sp-2   TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGCATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT
Sp-9   TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGCATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT
Sp-10  TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGCATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT
Sp-3   TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGCGCCTTACAACTATAGCCGTGTCTTGAGGTCAT
Sp-5   TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGCGCCTTACAACTATAGCCGTGTCTTGAGGTCAT
Sp-15  TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGCGCCTTACAACTATAGCCGTGTCTTGAGGTCAT
*****
Sp-1   61  CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA
Sp-2   CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA
Sp-9   CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA
Sp-10  CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA

```

Sp-3 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
Sp-5 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
Sp-15 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
\*\*\*\*\*  
Sp-1 121 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-2 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-9 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-10 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-3 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-5 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
Sp-15 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
\*\*\*\*\*  
Sp-1 181 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-2 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-9 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-10 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-3 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-5 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
Sp-15 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
\*\*\*\*\*  
Sp-1 241 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTAGAATTAGGTGCTAGTT  
Sp-2 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTAGAATTAGGTGCTAGTT  
Sp-9 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTAGAATTAGGTGCTAGTT  
Sp-10 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTAGAATTAGGTGCTAGTT  
Sp-3 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
Sp-5 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
Sp-15 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
\*\*\*\*\*  
Sp-1 301 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTACTGTACAGCTCCTAAGT  
Sp-2 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTACTGTACAGCTCCTAAGT  
Sp-9 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTACTGTACAGCTCCTAAGT  
Sp-10 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTACTGTACAGCTCCTAAGT  
Sp-3 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
Sp-5 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
Sp-15 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
\*\*\*\*\* \* \* \*\* \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*  
Sp-1 361 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
Sp-2 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
Sp-9 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA

Sp-10 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-3 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-5 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-15 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
 Sp-1 421 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-2 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-9 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-10 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-3 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-5 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-15 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTA  
 \*\*\*\*\*

SEQNO2 该 10 株螺旋藻品系的 16S-23S rRNA ITS 序列的多重序列比对分析结果

Sp-6 1 TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-1 TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-2 TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-9 TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-10 TTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-3 TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGGCCTTAACAACATAGCCGIGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-5 TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGGCCTTAACAACATAGCCGIGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-15 TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGGCCTTAACAACATAGCCGIGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-12 TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGGCCTTAACAACATAGCCGIGTCTTGAGGTCAT  
 Sp-16 TTAGGGAGACCTACTTCGAGATATCGGCCTTAACAACATAGCCGIGTCTTGAGGTCAT  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
 Sp-6 61 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-1 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-2 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-9 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-10 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-3 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-5 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-15 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-12 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 Sp-16 CCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCTTCAAACCTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTA  
 \*\*\*\*\*  
 Sp-6 121 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-1 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGG



Sp-2 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-9 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-10 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-3 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-5 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-15 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-12 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 Sp-16 TTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCAAGTCCAGG  
 \*\*\*\*\*  
 Sp-6 181 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-1 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-2 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-9 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-10 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-3 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-5 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-15 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-12 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 Sp-16 ATGCCCCACATCCACCCCAAACCTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCA  
 \*\*\*\*\*  
 Sp-6 241 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAAATTAGGTGCTAGTT  
 Sp-1 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAAATTAGGTGCTAGTT  
 Sp-2 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAAATTAGGTGCTAGTT  
 Sp-9 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAAATTAGGTGCTAGTT  
 Sp-10 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAAATTAGGTGCTAGTT  
 Sp-3 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
 Sp-5 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
 Sp-15 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
 Sp-12 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
 Sp-16 CGGCAGAAGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTGTGATGGTGCTAGTT  
 \*\*\*\*\*  
 Sp-6 301 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGT  
 Sp-1 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGT  
 Sp-2 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGT  
 Sp-9 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGT  
 Sp-10 GGGGTGAGGTAGTCTTGAATTGAGA--AATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGT  
 Sp-3 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
 Sp-5 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
 Sp-15 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT

Sp-12 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
 Sp-16 GGGGTGAGATGAGATGAGATGACCTCTGATAGATAATTTATCACTGTACAGCTCCTAAAT  
 \*\*\*\*\* \* \* \*\* \*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \*

Sp-6 361 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-1 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-2 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-9 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-10 CTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-3 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-5 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-15 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-12 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 Sp-16 CTTTAGATGTTAGTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAA  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Sp-6 421 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-1 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-2 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-9 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-10 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-3 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-5 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-15 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-12 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 Sp-16 CTGCATAGAGAAAAGCATAATGGGTAGGAAAACGTCGTAAGACAATTCCAATGTA  
 \*\*\*\*\*

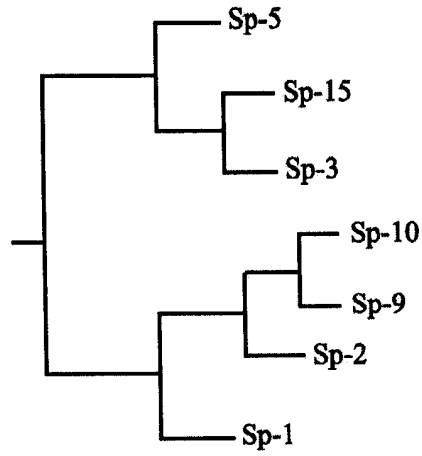


图 1

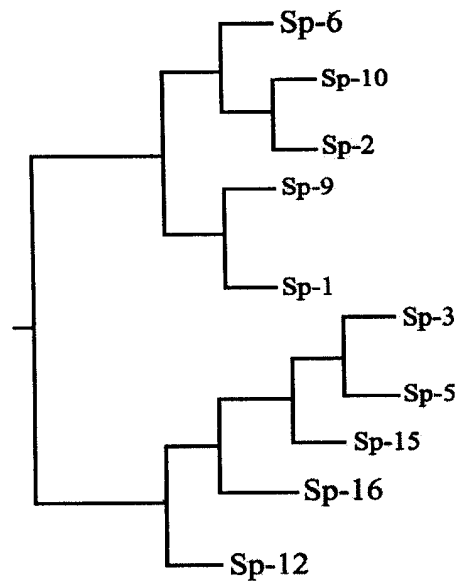


图 2