



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102830225 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210358235. 9

(22) 申请日 2012. 09. 24

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6602 2012. 09. 19

(71) 申请人 中国动物疫病预防控制中心

地址 100125 北京市朝阳区麦子店街道 20
号 902 室

(72) 发明人 王传彬 孙明 曹振 田克恭

王宏伟 金萍 陈西钊 刘伟
才学鹏

(74) 专利代理机构 北京金阙华进专利事务所

(普通合伙) 11224

代理人 吴鸿维

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

C07K 16/10 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

序列表 4 页

(54) 发明名称

一种源于禽流感病毒自然弱毒株的血凝素和
免疫抗原

(57) 摘要

本申请涉及一种来源于禽流感病毒自然弱毒
株(CN1 株)的血凝素和免疫抗原及其制备方法,
以及血凝素在检测血清抗体中的用途、免疫抗原
在接种动物用于产生免疫抗体中的用途。

1. 一种源于禽流感病毒自然弱毒株的血凝素和免疫抗原,其特征在于所述的禽流感病毒自然弱毒株为 CN1 株。其中所述的 CN1 病毒株为:保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院,中国科学院微生物研究所,保藏编号:CGMCC No. 6602。

2. 权利要求 1 中所述 CN1 株的识别特征是同时包含有核苷酸序列为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的 3 个基因节段。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫抗原,其中还包括药剂学上可以接受的稀释剂、赋形剂或免疫佐剂。

4. 根据权利要求 1 所述的血凝素和免疫抗原的制备方法,包括:将 CN1 株接种鸡胚培养,收获病毒液加入终浓度 1:5000 的 β -丙内酯,4℃灭活 10 小时,用作血凝素;加矿物油等佐剂按常规方法乳化,制成免疫抗原。

5. 根据权利要求 1 所述的血凝素在检测血清抗体中的用途。

6. 根据权利要求 1—3 任一项所述的免疫抗原在接种动物用于产生免疫抗体中的用途。

一种源于禽流感病毒自然弱毒株的血凝素和免疫抗原

技术领域

[0001] 本发明涉及动物疫病预防控制,尤其涉及一种用禽流感病毒自然弱毒株制备的血凝素和免疫抗原。

背景技术

[0002] 禽流感(Avian influenza, AI)是由A型流感病毒引起的禽类(包括家禽和野禽)的感染和/或感染综合征。鸡、火鸡、鸭、鹅和鹌鹑等家禽、野鸟、水禽和海鸟等均可感染。其疾病形式多样,可表现为无致病性感染,低致病性感染和高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)。爆发HPAI不仅使当地的养禽业遭受毁灭性打击,而且显著地影响禽类产品的国际贸易,世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须报告疫病,我国将其列为一类动物疫病。

[0003] AI的病原为禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV),AIV的亚型众多,其中按血凝素(Haemagglutinin, HA)划分为16种(H1~H16)亚型,历史上所有的高致病性禽流感均是由H5和H7亚型AIV引起的。H5和H7亚型AIV除了对养禽业有重要意义之外,它们还有重要的公共卫生意义,H5和H7亚型AIV均有感染并致死人类的报道。

[0004] 到目前为止,我国已分离鉴定的高致病性禽流感病毒均为H5亚型病毒,所以此前的研究集中于H5亚型禽流感病毒及其免疫抗原,用于制造H5亚型禽流感疫苗或诊断试剂。发明人在国内首次分离到H7亚型禽流感病毒(CN1株),并进行了一系列研究。发明人在研究中发现,该病毒具有致病力很低的特征,后来又经过多次传代培养,使该病毒更加适应鸡胚培养条件,获得病毒的滴度很高,而病毒致病力仍然很低。将此培养物经过一定工艺灭活,仍能保留血凝素活性;研制成免疫抗原,接种鸡可以产生很好的抗体滴度,抗体能维持6个月以上。因此,这种用H7亚型禽流感病毒自然弱毒株来制造的血凝素和免疫抗原,对于防控H7亚型禽流感具有重要意义,并且这项技术在国内未见报道。

[0005] 国内现有H7亚型禽流感病毒血凝素及免疫抗原,是用1979年获得的国际标准毒株A/Afri.Star/Eng-Q/983/79/(H7N1)研制的,存在以下技术缺陷:1、禽流感众所周知的特性是病毒变异性高,即使同一种亚型的不同来源毒株,其抗原性也存在一定差异。用1979年的标准毒株制备的血凝素,用来作血凝抑制实验、检测临床血清时,会出现滴度偏低、敏感度下降的问题;2、用标准毒株制成免疫抗原或疫苗来免疫动物,由于标准毒株抗原性与国内流行株抗原性存在差异,会导致保护效果下降。

发明内容

[0006] 本发明所解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种用国内分离的禽流感病毒自然弱毒株(A/CK/CN/1/2002(H7N2),简称CN1株)制备的血凝素和免疫抗原。CN1株保藏信息如下:

[0007] 分类命名:禽流感病毒

[0008] 拉丁文学名:Avian influenza virus, AIV

[0009] 保藏单位 : 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)

[0010] 地址 : 北京市朝阳区北辰西路 1 号院, 中国科学院微生物研究所

[0011] 保藏日期 : 2012 年 9 月 19 日

[0012] 保藏编号 : CGMCC No. 6602。

[0013] 本发明是通过以下技术途径实现的 :

[0014] 本发明人从我国鸡群中分离到的 H7N2 亚型禽流感病毒株 (保藏编号 : CGMCC No. 6602), 在鸡胚中连续传代培养, 再通过有限稀释法纯化病毒, 然后测定病毒血凝素效价 ; 进行本动物接种试验, 评价病毒的致病性 ; 用病毒培养物制成灭活的血凝素 ; 用病毒培养物制成矿物油佐剂免疫抗原, 接种鸡以后定期测定抗体水平。通过测定 CN1 株 HA、NA 和 M 基因, 确定这种血凝素与免疫抗原的分子识别标志。

[0015] 具体方法为 : 1、病毒分离培养 : 将鸡群禽流感监测过程中采集的样品, 过滤除菌后, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 在 37℃ 继续孵育。72 小时左右鸡胚死亡, 收集尿囊液, 用同样方法作传代培养。按 GB/T18936-2003 规定方法, 用 1% 鸡红细胞测定分离物的血球凝集活性。2、病毒鉴定 : 对于具有血球凝集活性的培养物, 按照《禽流感》(第一版, 北京农业大学出版社, 1995) 介绍的方法, 鉴定病毒血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 亚型 ; 3、病毒纯化 : 将收获的病毒液进行 10 倍比的系列稀释, 接种 10 日龄鸡胚培养, 72 小时左右, 选择最高稀释度的死亡鸡胚, 测定血凝活性, 再次进行 10 倍比的系列稀释后按同样方法传代培养, 共传 5 代, 获得纯化的病毒 ; 4、致病性试验 : 按照《禽流感》(第一版) 介绍的方法, 将纯化的病毒接种 SPF 鸡, 测定“静脉接种致病指数 (IVPI)” ; 5、制备血凝素 : 将纯化的 CN1 株加入终浓度 1 : 5000 的 β -丙内酯, 4℃ 灭活 10 小时, 测定血凝素效价, 按常规方法冻结或冻干保存, 用作血凝素 ; 6、将纯化的 CN1 株按前述方法用 β -丙内酯灭活, 测定血凝素效价, 加矿物油佐剂按常规方法乳化, 制成免疫抗原 ; 7、将制成的免疫抗原接种 6 周龄 SPF 鸡, 定期采集血清, 用血凝抑制实验测定抗体水平, 实验中采用的是上述 CN1 株血凝素。8、测定病毒的基因序列 : 参照国内外已发表的禽流感病毒 HA、NA 和 M 基因节段的序列, 设计针对 HA、NA 和 M 基因节段的扩增引物和反转录引物, 按常规方法进行克隆测序, 得到 CN1 病毒株 HA、NA 和 M 基因片段的核苷酸序列。

[0016] 血凝素效价测定表明, CN1 株制备的血凝素效价达到 1024, 具有较高的效价, 因此可以用于制备血凝素试剂和免疫抗原。

[0017] 致病性试验表明, CN1 病毒接种 SPF 鸡后 10 天, 未观察到明显症状。静脉接种指数 (IVPI) 为 0, 无致病性, 说明病毒传 5 代后毒力没有增强, 是难得的 H7 亚型自然弱毒株, 灭活后用于制造血凝素和免疫抗原是很安全的, 具有实际应用价值。

[0018] 免疫原性试验表明, CN1 株制备的免疫抗原接种 SPF 鸡以后 1 周 (1WPI), 即可检出针对 H7 亚型 AIV 的 HI 抗体, 接种后第 5-8 周为抗体水平高峰期, 其后缓慢下降, 直至第 28 周仍可检出抗体 (HI 效价高于 16)。

[0019] 病毒的 HA 基因序列见 SEQ ID NO : 1 ; NA 基因序列见 SEQ ID NO : 2 ; M 基因序列见 SEQ ID NO : 3。

具体实施方式

[0020] 实施实例 1

[0021] 病毒分离鉴定

[0022] 从鸡场采集样品,经过滤除菌后,接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,在 37℃继续孵育。72 小时左右鸡胚死亡,收集尿囊液,用同样方法作传代培养。按《禽流感》(第一版)的方法,用 1% 鸡红细胞测定分离物的血球凝集活性。

[0023] 按《禽流感》(第一版)介绍的方法,用红细胞凝集抑制(HI)试验确定病毒的血凝素亚型。按《禽流感》(第一版)介绍的神经氨酸酶(NA)活性抑制(NI)实验方法,测定病毒 NA 亚型。

[0024] 结果:鸡胚在接种 CN1 株后 72 小时左右死亡,胚体充血。初代尿囊液血凝价为 256,经多次传代后,尿囊液的血凝价为 1024。病毒被鉴定为 H7N2 亚型禽流感病毒。

[0025] 实施实例 2

[0026] 病毒的致病性测定

[0027] 按《禽流感》(第一版)介绍的方法进行。将 14 只 SPF 鸡随机分二组,在两个负压隔离器中饲养,各组分别为 10 只和 4 只。经检验无菌的 CN1 株鸡胚尿囊液,对 1% 鸡红血球凝集效价为 1024,用生理盐水作 1:10 稀释,接种一组鸡 10 只,每只鸡经翅静脉注射 0.1ml,另外四只鸡注射生理盐水作为对照。每天观察并记录鸡群情况,至接种后 10 天,计算静脉接种致病指数(IVPI)。

[0028] 结果:IVPI 值为 0。病毒对实验鸡无致病性,是自然弱毒株。可用于研制血凝素和免疫抗原,生产和使用过程可以保证安全,因此具有实际应用价值。将 CN1 病毒保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 6602。

[0029] 实施实例 3

[0030] 血凝素制备及效价测定

[0031] 将纯化的 CN1 株加入终浓度 1:5000 的 β -丙内酯,4℃灭活 10 小时,按 GB/T18936-2003 规定方法,用 1% 鸡红细胞测定分离物的血球凝集活性,分装后冻结保存,用作血凝素。

[0032] 结果:灭活病毒制备的血凝素效价为 1024。

[0033] 实施实例 4

[0034] 免疫抗原制备及接种动物产生抗体的测定

[0035] 将 CN1 株病毒液,加入终浓度为 1:5000 的 β -丙内酯,4℃灭活 10 小时,测定血凝素效价,加矿物油佐剂按常规方法乳化,制成免疫抗原,接种 6 周龄 SPF 鸡 8 只,每周采集少量血清一次,按 GB/T18936-2003 规定方法,用上述 CN1 株血凝素来做血凝抑制实验,测定血清抗体水平。

[0036] 结果:以血清抗体 HI 效价高于 16 为检测阳性的判界,CN1 株制备的免疫抗原接种 SPF 鸡以后 1 周,即可检出针对 H7 亚型 AIV 的血清抗体,接种后第 5-8 周为抗体水平高峰期,其后缓慢下降,直至第 28 周仍可检出抗体,之后出现了部分鸡的抗体水平低于 16 的情况。这说明,用 CN1 株制备免疫抗原,接种鸡产生的抗体可以维持半年以上,具有较好的免疫原性。

[0037] 实施实例 5

[0038] 病毒基因序列测定

[0039] 参照国内外已发表的禽流感病毒 HA、NA、M 基因节段的核苷酸序列,设计针

对 HA、NA、M 基因节段的扩增引物(见表 1) 和反转录通用引物 :5' AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:4) (参 考 文 献 :E.Hoffmann, J.Stech, Y.Guan, et al.Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses.Archives of Virology, 2001, 146:2275-2289.)。提取病毒总 RNA,反转录 (RT) 合成 CDNA,经 PCR 扩增后,凝胶电泳回收各基因节段的 PCR 产物,分别与 pGEM-T Easy 载体连接成 pGEM-TE-X (“x”代表 HA、NA、M 基因),构建重组质粒转化感受态细胞,挑选 PCR 阳性的克隆,测定核苷酸序列。

[0040] 表 1 针对各基因节段的 PCR 引物

基因	位置	引物序列
HA	上游	GACAAATGCAGACAAAATATGC (SEQ ID NO: 5)
	下游	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO: 6)
NA	上游	AGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO: 7)
	下游	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT (SEQ ID NO: 8)
M	上游	AGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO: 9)
	下游	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT (SEQ ID NO: 10)

[0042] 结果 :病毒的 HA 基因序列见 SEQ ID NO :1 ;NA 基因序列见 SEQ ID NO :2 ;M 基因序列见 SEQ ID NO :3。

[0001]

序 列 表

<110>中国动物疫病预防控制中心

<120>一种源于禽流感病毒自然弱毒株的血凝素和免疫抗原

<160>10

<210>1

<211>1663

<212>DNA

<213>流感病毒属 (Influenza virus)

<400>1

```
acaaatgcagacaaaatatgccttgggcattcatgccgtgtcaaacggaac 50
taaggtanaacacactaactgaaagaggggtggaagttgtcaatgcaactg 100
aaacagtggagcgaacaaacattcccaggatctgtcacaaagaaaaaga 150
acaatcgaccttggccaatgtggactgtctgggaacaatcactggaccacc 200
ccaatgtgaccaattcctagaattctcagctgatttgattattgaaagge 250
gggaaggaaatgatgtctgtttatcctgggaatttgtaaacggagaagct 300
ctgagacaaaattctcaggaatcaggcgggaattgataaggagataatggg 350
gttcacatacagcgaanaaagaactaatggaacaaccagtgcattgtagaa 400
gatcaggatcttctgttctatgcagagatgaaatggcttttgtcaaataca 450
gacaatgtctgtttcccgcatgactaagtcgtacaaaaacacaaggaa 500
agaccagctctgataatctggggaatecatcattccggatecaagcacag 550
aacagaccaaattatattgggagtggaagcaaactaataacagttgggagt 600
tecaattatcaacagtcctttgtaccgagtcgggggagaggccacaagt 650
gaatggccaatctggaaggatcgacttccattggctgatgctaaatccca 700
atgacacagtcactttcagtttcaatggggctttcatagctccagaccgt 750
gcaagttttctgagagggaagtctatggggattcagagtgtgtacaagt 800
tgatgccaatgtgagggggattgctatcatagtgagggaacaataataa 850
gtaatttgccttttcagaatatcaatagcagagcagtaggaaaatgtccg 900
aggtatgttaaacaagagagcctgtacttggaacagggatgaagaacgt 950
tcccgaattccaaaaggaagaggcctatttgggtgcatagcgggtttca 1000
ttgaaaatggatgggaaggctctgattgatggatgggtatggcttcaggcat 1050
caaatgcacaaggagagggaactgcggcagattacaagagcactcaatc 1100
ggcaattgatcaataacaggaaagttaaaccggctcatagagaaaacta 1150
accaacagtttgattgatagacaatgaattcactgaggttgaagagcaa 1200
attggcaatgtgataaattggaccagagattccataacagaagtgtggtc 1250
ctacaatgccgaactcttagtggaatggagaatcagcacactatcgatc 1300
tggccgattcagaaatgaacaagctgtacgaaagagtgaggagacaattg 1350
agggagaatgtcaggaagacggcacagggttgggttgcgaaatatttcaca 1400
gtgtgagacgactgtatggccaglatlagaacaacacttatgatcaca 1450
gcaaatlacagagaagaagcaatgcaaaataggatlacagattgaccagtc 1500
aaactgagcagcggtacaaagatgtgatactttgggttagcttcggggc 1550
atcatgtttcatacttctggccattgcaatgggccttgtcttcatgtgtg 1600
lgaagaatlgaaacatgcggtgcactatttgtataglttggaaaacac 1650
ccttgtttctact 1663
```

[0002]

<210>2

<211>1467

<212>DNA

<213>流感病毒属 (Influenza virus)

<400>2

```
agcaaaagcaggagtgaaaatgaatccaaatcaaaagataataacaattg 50
gctctgtctcactcaccattgcaacaatatgcttcctcatgcagattgct 100
atcctggcaactactgtgacactgcattttaagcaacatgaatgcaaccc 150
ccctgcaatcaaccaagtgaccccatgtgaaccaatcatagtagaaagga 200
acataacagggatagtgtatttgaacagcaccagtatagagagagagatt 250
tgccccgaagctgtggaatacagaaattggtcaaagccgcagtgtcaaatt 300
tacaggatttgcctcttctctaaggacaattcaattcggcttctgtctg 350
gtggggacatttgggtgacgagagaaccttatgtgtcatgtgatcctggt 400
aaatgttatcaatttgcacttggacaggggaccacactagacaacaaaca 450
ttcgaatggtacaatacatgatagaatccctcatcggaactctcttgatga 500
acgaattgggtgttcogttccatttagggaccaacaagaatgcatagca 550
tgggtccagctcaagttgtcacgatggaagagcatggttgcataatttgtgt 600
tactgggatgatagaaatgcgactgccagtttcatattatgacgggaggc 650
ttgtcgacagtattggttcatggtctcaaaatattctcagaacacaggag 700
tcagaatgtgtttgtatcaatgggacttgcactgtagtaatgactgatgg 750
aagtgcacaggaagagccgatacgagaatactattcattaaagaggggga 800
aaattgtccatattagcccattgtcaggaagtgtcagcatatagaggaa 850
tgttcctgttatcctogatatcctgacgccagggtgtatctgcagagataa 900
ctggaaaggctotaataggcccgttatagacataaatatggcagattata 950
gcattgattccagttatgtatgttcagggtcgttgggtgacacaccaga 1000
aatgacgacagctccagcagtagcaattgcagggatccctaataatgagag 1050
agggaatccaggggtgaaaggctgggcttttgataatggagatgatgtgt 1100
ggatggggagagaacaatcagcaaagattcacgctcagggttacgagactttc 1150
aaagtcatttgggtggttgggtccacacctaattccaagtcgcagggtcaatag 1200
acaggtcatagttgacaacaataacaggtctggttactctggtattctct 1250
ctgttgaggggcaaaagctgcatcaataggtgtttttatgtggagttgata 1300
aggggaagaccacaggaaactagagtatgggtggacttcaaacagtattgt 1350
tgtattttgtggcacttcaggtacctatggaacaggctcatggcctgatg 1400
gggcgaacatcaattttatgcctacataagctttcgcaatttttagaaaaa 1450
aactccttgtttctact 1467
```

<210>3

<211>1027

<212>DNA

<213>流感病毒属 (Influenza virus)

<400>3

[0003]


```

agcaaaagcaggtagatattgaaagatgagtccttctaaccgaggctcga 50
cgtagcttctctctatcgtcccgtcaggccccctcaaagccgagatcgcg 100
cagagacttgaagatgtctttgcagggaagaacactgatctogaggctct 150
catggaatggctaaagacaagaccaatcctgtcacctctgactaagggga 200
ttttagggtttgtgttcacgctcaccggtgocccagtgagcgaggactgcag 250
cgtagacgctttgtccagaatgccttaaatgggaatggagacccaaacaa 300
catggacagggcagtcaaaactatacaggaagctgaaaagagagataacat 350
tccatggggctaaagagggttgcactcagctattcaaccgggtgcacttgcc 400
agttgcatgggtctcatatacaacaggatgggaacggtaaccacagaagt 450
agcttttggcctgggtgtgtgccacttgtgagcagattgctgactcacagc 500
atcgatctcacagacagatgggtgactaccaccaaccactaatcaggcat 550
gaaaacagaatgggtgctggccagcactacagctaaggctatggagcagat 600
ggctggatcgagtgaacaggcagcggaagccatggagggtgctagtcagg 650
ctaggcagatgggtgcaggcaatgaggacaattgggactcacccctagctcc 700
agtgccgggtctgaaaaatgatcttcttgaaaatttgcaggcctaccagaa 750
gcggatgggagtgcaaatgcagcgattcaagtgatcctctogttattgcc 800
gcaagtatcattgggatcttgcacttgatattgtggattcttgatcgtct 850
tttcttcaaatgtatttatcgtcgccttaaatacggtttgaaaagagggc 900
cttctacggaaggagtgcttgagtcctatgaggggaagagtatcggcaggaa 950
cagcagagtgtgtggatgttgacgatggtcattttgtcaacatagagct 1000
ggagtaaaaaactaccttgtttctact 1027

```

<210>4

<211>12

<212>DNA

<213>反转录引物

<400>4

AGCAAAAGCAGG

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213>HA 上游引物

<400>5

GACAAATGCAGACAAAATATGC

<210>6

<211>12

<212>DNA

<213>HA 下游引物

<400>6

AGTAGAAACAAGGGTGT

[0004]

<210>7

<211>15

<212>DNA

<213>NA 上游引物

<400>7

AGCAAAAGCAGGAGT

<210>8

<211>21

<212>DNA

<213>NA 下游引物

<400>8

AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT

<210>9

<211>15

<212>DNA

<213>M 上游引物

<400>9

AGCAAAAGCAGGTAG

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213>M 下游引物

<400>10

AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT

专利名称(译)	一种源于禽流感病毒自然弱毒株的血凝素和免疫抗原		
公开(公告)号	CN102830225A	公开(公告)日	2012-12-19
申请号	CN201210358235.9	申请日	2012-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	王传彬 孙明 曹振 田克恭 王宏伟 金萍 陈西钊 刘伟 才学鹏		
发明人	王传彬 孙明 曹振 田克恭 王宏伟 金萍 陈西钊 刘伟 才学鹏		
IPC分类号	G01N33/531 C07K16/10		
其他公开文献	CN102830225B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种来源于禽流感病毒自然弱毒株 (CN1株) 的血凝素和免疫抗原及其制备方法, 以及血凝素在检测血清抗体中的用途、免疫抗原在接种动物用于产生免疫抗体中的用途。

基因	位置	引物序列
HA	上游	GACAAATGCAGACAAAATATGC (SEQ ID NO: 5)
	下游	AGTAGAAACAAGGGTGTITT (SEQ ID NO: 6)
NA	上游	AGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO: 7)
	下游	AGTAGAAACAAGGAGTTTTT (SEQ ID NO: 8)
M	上游	AGCAAAAGCAGGTAG (SEQ ID NO: 9)
	下游	AGTAGAAACAAGGTAGTTTT (SEQ ID NO: 10)