



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112980713 A

(43)申请公布日 2021.06.18

(21)申请号 201911298808.1

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2019.12.17

G01N 33/569(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12R 1/01(2006.01)

CCTCC M 2019765 2019.09.27

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 焦新安 殷月兰 姚浩 王玉婷

孟凡增 凌志婷 潘志明 王晶

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表5页 附图6页

(54)发明名称

单核细胞增生李斯特菌血清型4h的血清诊断试剂盒的制备及应用

(57)摘要

本发明公开了一种单核细胞增生李斯特菌XYSN及其用途,发明人从暴发李斯特菌病的羊脑内分离并保存获得,保藏号为:CCTCC NO:M 2019765。采用单核细胞增生李斯特菌XYSN可以制备多克隆抗体,用于鉴别或者免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌,具有十分重要的科研和实际应用意义。

1. 一种单核细胞增生李斯特菌XYSN,其特征在於:所述单核细胞增生李斯特菌XYSN的保藏号为:CCTCC NO:M 2019765。
2. 根据权利要求1所述的单核细胞增生李斯特菌XYSN,其特征在於:所述单核细胞增生李斯特菌XYSN核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。
3. 如权利要求1~2任一项所述的单核细胞增生李斯特菌XYSN用于制备多克隆抗体的用途。
4. 一种多克隆抗体,其特征在於:所述多克隆抗体采用单核细胞增生李斯特菌XYSN作为免疫原制备获得。
5. 如权利要求4所述的多克隆抗体用于鉴定或者免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的用途。
6. 一种鉴定血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的方法,包括步骤:将待鉴定对象与所述权利要求4中的多克隆抗体进行混合。
7. 一种免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的方法,包括步骤:用所述权利要求4中的多克隆抗体标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌。
8. 如权利要求4所述的多克隆抗体的制备方法,所述方法为:利用单核细胞增生李斯特菌XYSN免疫动物获得。
9. 根据权利要8所述的制备方法,其特征在於,所述方法包括以下步骤:
 - (1) 利用单核细胞增生李斯特菌XYSN制备免疫原,免疫动物;
 - (2) 采血,获得含有多克隆抗体的血清。
10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在於:所述动物选自兔子、鼠、鸡、猪或羊。
11. 一种试剂盒,其特征在於:所述试剂盒内含有如权利要求4所述的多克隆抗体。
12. 如权利要求11所述的试剂盒用于鉴定或者免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的用途。

单核细胞增生李斯特菌血清型4h的血清诊断试剂盒的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种单核细胞增生李斯特菌XYSN及其用途。

背景技术

[0002] 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, Lm) 是一种革兰阳性兼性胞内寄生菌,对环境具有极强的耐受性,能感染包括哺乳动物、鸟类、鱼、和甲壳类等40多种动物,其中反刍动物为易感宿主,感染后死亡率为20%-100%。动物源Lm通过污染农场并经食品加工环节传染给人,是导致人类李斯特菌病的重要原因,其能穿越肠道屏障、胎盘屏障、血脑屏障引起脑膜炎、败血症、流产等人兽共患李斯特菌病,以老人、新生儿、孕妇及免疫力低下的人群为主,且死亡率高达20%-30%,具有重要的公共卫生学意义。

[0003] 到目前为止,食源性病原菌单核细胞增生李斯特菌由14种血清型(1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e、4h、7)构成,其中血清型4h是我国新发现的一种血清型,研究表明,该血清型的单核细胞增生李斯特菌已引起动物李斯特菌病的暴发,具有超强毒力,对公共卫生安全造成了极大的威胁。因此,建立快速有效的检测和鉴定血清型4h单核细胞增生李斯特菌的方法,对于李斯特菌的监测、预防与控制非常要重。目前现有的血清诊断试剂盒不能有效鉴定血清型4h的单核细胞增生李斯特菌,因此制备针对血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的诊断试剂盒显得尤为必要。

发明内容

[0004] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种单核细胞增生李斯特菌XYSN及其用途,用于解决现有技术中缺乏有效的鉴定血清型4h的单核细胞增生李斯特菌手段。

[0005] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种单核细胞增生李斯特菌XYSN,所述单核细胞增生李斯特菌XYSN的保藏号为:CCTCC NO:M 2019765。

[0006] 本发明采用的微生物XYSN是发明人从暴发李斯特菌病的羊脑内分离并保存。

[0007] 本发明的单核细胞增生李斯特菌XYSN菌株进行形态特征鉴定,鉴定结果为:

[0008] 形态特征:本属菌为革兰阳性杆菌,显微镜下观察呈短杆状,两端钝圆或球状,大小为(0.4~0.5) μm ×(0.5~2.0) μm 。需氧或兼性厌氧,无芽孢,不产生荚膜,20-25 $^{\circ}\text{C}$ 能运动,37 $^{\circ}\text{C}$ 不运动,过氧化氢酶阳性。DNA的(G+C)mol%为36~37.95。

[0009] YYSN菌株的主要生理生化特性:该菌能分解葡萄糖、麦芽糖、七叶苷、乳糖、甘露糖、海藻糖,不能分解鼠李糖、甘露醇、木糖,MR-VP试验阳性,磷脂酰磷脂酶C试验阳性,磷酸酶试验阴性,尿素酶试验阴性。

[0010] 经形态学鉴定和16S rRNA扩增序列发育树分析,确定该菌株为单核细胞增生李斯特菌,按照国际命名规则:属名+种名+株名对该菌株进行命名,属名、种名、株名分别为

Listeria、monocytogenes和XYSN,命名为Listeria monocytogenes XYSN,保藏号为:CCTCC NO:M 2019765。本发明分离的Listeria monocytogenes XYSN的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0011] 本发明的单核细胞增生李斯特菌XYSN已于2019年9月27日在中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC)注册保藏,保藏号为CCTCC NO:M 2019765。

[0012] 本发明的另一方面提供了上述单核细胞增生李斯特菌XYSN用于制备多克隆抗体的用途。

[0013] 本发明的另一方面提供了一种多克隆抗体,所述多克隆抗体采用单核细胞增生李斯特菌 XYSN作为免疫原制备获得。

[0014] 进一步地,所述免疫原免疫的对象为兔子。例如新西兰大白兔。

[0015] 本发明的另一方面提供了上述多克隆抗体用于鉴定或者免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的用途。

[0016] 本发明的另一方面提供了一种鉴定血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的方法,包括步骤:挑取新鲜培养的单核细胞增生李斯特菌与上述多克隆抗体混匀,观察凝集反应,若发生凝集,则说明该单核细胞增生李斯特菌的血清型是4h。

[0017] 本发明的另一方面提供了一种免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的方法,包括步骤:用上述多克隆抗体标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌。

[0018] 上述多克隆抗体可作为一抗与血清型4h的单核细胞增生李斯特菌结合,然后用带有荧光的二抗与上述多克隆抗体结合,从而标记出血清型4h的单核细胞增生李斯特菌。

[0019] 本发明的另一方面提供了上述多克隆抗体的制备方法,所述方法为:利用单核细胞增生李斯特菌XYSN免疫动物获得。

[0020] 具体地,所述方法包括以下步骤:

[0021] (1) 利用单核细胞增生李斯特菌XYSN制备免疫原;

[0022] (2) 免疫动物;

[0023] (3) 采血,获得含有多克隆抗体的血清。

[0024] 进一步地,所述步骤(1)中制备免疫原的方法可以是,收集37℃培养箱静置培养24小时单核细胞增生李斯特菌XYSN,PBS洗2遍,调整适当细菌浓度,沸水浴煮1小时,破坏细菌的H抗原,加入苯酚至终浓度为0.5%,最后超声破碎。

[0025] 进一步地,所述步骤(2)中动物选自兔子、鼠、豚鼠、鸡、猪或羊等。

[0026] 进一步地,所述步骤(2)中免疫的方法为采用抗原多次接触动物,例如可以采用如下操作:耳静脉免疫成年新西兰大白兔,首次免疫剂量为0.5mL (0.5×10^9 CFU),间隔4天免疫,共5次,每次增加0.5mL免疫原。

[0027] 进一步地,所述步骤(3)中采血前还包括对动物血清抗体效价的测定以保证血清中的多克隆抗体达到有效剂量,例如可以采用ELISA法。

[0028] 进一步地,所述步骤(3)包括采血后进行后处理,所述后处理的方法为静置、离心,上清液为含有多克隆抗体的血清。

[0029] 本发明的另一方面提供了一种试剂盒,所述试剂盒内含有上述多克隆抗体。

[0030] 本发明的另一方面提供了上述试剂盒用于鉴定或者免疫荧光标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌的用途。

- [0031] 如上所述,本发明的单核细胞增生李斯特菌XYSN及其应用,具有以下有益效果:
- [0032] 采用本申请中的多克隆抗体检测血清型4h的单核细胞增生李斯特菌,灵敏度高,特异性好,能够对血清型4h的单核细胞增生李斯特菌进行有效的鉴定和荧光标记。
- [0033] 本发明菌株保藏信息如下:
- [0034] 菌株名称:Listeria monocytogenes XYSN;
- [0035] 保藏号为:CCTCC NO:M 2019765;
- [0036] 保藏日期:2019年9月27日;
- [0037] 保藏单位名称:中国典型培养物保藏中心;
- [0038] 保藏单位简称:CCTCC;
- [0039] 保藏单位地址:武汉市武昌珞珈山街道武汉大学生命科学院。

附图说明

- [0040] 图1兔多抗血清抗体效价检测结果:
- [0041] 血清稀释比分别为1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400、1:204800、1:409600。
- [0042] 图2玻板凝集鉴定结果:
- [0043] 1-3.单核细胞增生李斯特菌血清型4h菌株;4-15.依次为血清型1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d和7的单核细胞增生李斯特菌;16.伊氏李斯特菌;17.无害李斯特菌;18.塞氏李斯特菌;19.格氏李斯特菌;20.威氏李斯特菌;21.血清型4h的单核细胞增生李斯特菌XYSN (PBS)。
- [0044] 图3 4h兔多抗血清荧光标记结果:
- [0045] 1-3.单核细胞增生李斯特菌血清型4h菌株;4-15.依次为血清型1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d和7的单核细胞增生李斯特菌;16.伊氏李斯特菌;17.无害李斯特菌;18.塞氏李斯特菌;19.格氏李斯特菌;20.威氏李斯特菌。

具体实施方式

- [0046] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。
- [0047] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。
- [0048] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实

现本发明。

[0049] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0050] 材料及其来源:

[0051] BHI培养基(Bacto™ Brain Heart Infusion)购自BD公司;羊抗兔IgG购自Bioworld公司;山羊抗兔(Alexa 488)购自Abcam公司;DAPI购自碧云天公司;TMB购自Solarbio公司。

[0052] 实施例1:单核细胞增生李斯特菌XYSN的分离提取与16S rRNA检测

[0053] 单核细胞增生李斯特菌XYSN由发明人从暴发李斯特菌病的羊脑内分离保存。XYSN的16S rDNA是细菌染色体上编码16S rRNA相对应的基因序列,其序列如SEQ ID NO.1:

[0054]

tgaataatagttgatattcaagttcttctcctctgaaaacagacggttaccaattgaaactgtacctctaattttccaccagagtaagggttt
gtttctgatctgcaagcaattgagttagttctgttgcaactcagatatactgctttatcactaagaaaaactaatgccatctttgtgccttaattg
aacattcttctcatataccattcaccgccaacatttatactctagcctttagatatacactaactcaaatataatgataataaaaaatactttttgaa
aaaacagcttgaaatcgcaagctgtggatattcaccacagtcatacttttcaagtaatagcgacttcaaactgttaaattacgatagttattctgatt
aaccaaacgatcaagaaacaatcggaatgggaaaaagacaactaaaaagaatgctaaattaatcaaaatggttgtccataaacgctgatcaata
aaaactgggatagacatggttgtcgtaccgalttaataataaaacgcataactaaactttctgtaagaataataataatcgcaaltaaccaac
caaaagtatattttgtaacactttcataaattatctgtgatatacacagtaaacgggaagatagcaaaataatgccatcacgccagtataata
aatacaaacagcaagcctagaataaaaagcatatgctaaagtcgtatttctgtataaaaaaagtcataatgcaacataataagtaaaaaatgc
ggaataaaaagatgtctatcaaaaaagaccattcgcaactgaagactaaaaacacctctaaaataaagggtccaacctgattgcaggaagt
gcaatgttttttaacattcatgattattggcctccagtcgtgtctgaactagttgtatcgtcatccgtcgtccctgcttccgctgaacgctcaacaca
gttacatggtttagatcatacatgacgacactggcttaataaacgcggttgagataatccattttatcagtttctacttttcaattgtaccgataaag
atacctgctgggaattcccaccgagtcagaaagtaacaactttctgtccttttttaatttcatgtcatacggtaattgttttaatttagcaacttagtat
cactgtcataaccattgataatcccgaatgcatttcttgcctgcactttagcagaacacggtttttaacatccgatgaagttaataatcaactgt
ggctgatttagcgctgtcgttgttactttaccaataagaccacttgggtgtgtaactgccatatcaggttttactccatcacttgaccctttgtcgattc
tactgtacattccaattagtaggatttctagaaatgacagaagcattaaagtgatcgtagtcgcaataactatcagtaatacaagactttctttaa
ctttatttctttttcaagtctgcaacttcactttcaagt

gaatgtacaatagaagtatatagattggcgttactaattccattaaaaagtagattatcgggataggctttcacagcatctagactttcctcta
aaaaaaagaaaggaaaaatgggatgatatgataaaaagcaagttctttgacaataattacacccgagaagcggataaaaaatgatttttca
ctggaaaacattctcctgcgactgaaatgaaagacataaataccgcactataaatgtaataaaaaagtaaatcatctgtcacctcctagttgtaaa
aacagaatagcagagacgaaatttttgcacatagctaaaatcacttttccatcttattgcalaacaaaaacaccttttcatagtgaaaaacag
gtgttttatataatttctctgaaaatccttttttagctatttgttctttttatttctcacagtatactcgaattatcaaaaagattaacgtattgaggccaac
aaatattccgcacttctgaaatgaaataaagcgcacccgtaataaagatttctgattagttccgtttcgtaaagattattaatgcttgttccaatct

ggattcaaagaaatccttcattttccctatttgtattactctccgccatcatagctctaggataatcaaagtagttagtattttctgcaattggaaat
 tgactttaacatcgctaacatttctgatagttttatcagctaataactcactattattttctaggcccaggatacttttgacggaaatgagcgaatgtt
 ttaattcctctggattatgcgctccatccaacataataaatggattgaaatgattttccattcgtcctggccaaaatgcttttccaagcccttctaa
 ttgccgcaaatcaattcaaaggtagaaaatgtattaaactgtataactttaatagctaccgctgcgttattcaattgatgcagaccaaacagtc
 caatggaaagattgcttatttctccataaatggtttatagttatattccatttcattatgcatggaaaaagccttattcaattgggtaacattagat
 ttattcttgtgctatctcagctataactcttgagctcttttgtatagcacctgaaacaactggatgcccgcttaattatgccagctttcactagc
 aattgctcgattgatcccaaggaaatccatgtgatccatcccaattgtggaatfacagaaactagtggaactagaatattcgtagagtcagctc
 tccgcaagtccaactcgcataatccaatcgcgatggaaacataatccgaaaacataaaaacatcatagcagtaataatttcaaatctgaaggt
 ggiccataaacagttttctagctctctgcaataggtttaattcggttagctaatgaaacaatcattcgcgtaattggttcaccattaacactaatt
 cgttcattaaaaactcaatgta

[0055]

gaagtgatttagtcagagcttctagaggccgtgggggaccaagggtgatgacgatgccgcttcttagagaaaatcaaaataggcttga
 aaaatgagaattcccttcaaaatgcgacttctgctaaaagtattgtggcgatttaagatgtgctatagtgtttcaaacagaatttctgagaaat
 ctgctggtagtttgcgctatgatataatatttattgtgagtaattataaattattccttgcctccttgattttaaaggcttctaaaggcagctggatt
 caaggataggtatggttcatgctatatacagagccgcttaagaccacaaggaggtgtagagtagatgcttagaaagtacgaaattatgtacatca
 ttcgcccacaactgaagaagatgagaaaaagctgtgtagaacgcttgacggaatcttaactgaaaatggtgcggagatcatcgaatcaaaa
 gaatggggtaaacgctgcttagcatalcgaatcaatgaactcgtgatggttttaccacatcgtgaaatlaaacgctgataaagcagattctatcaa
 cgaatttgaccgttagctaaaattctgatgatacattcgtcatatggtaattaaagaagaagcataagaatttattcaaggctaggacctgattta
 ctaaacgagaggaggttggtttgcgatgatgaatcgtgtagtactgtaggacgcttaacaaaagatcctgaattacgttacactccagctgggtg
 gctgttgcgactttacattagctglaaatcgcactttcactaaccaacaaggagaacgagaagctgactttattaattgtgttggcgtaaaccg
 gcagaaaacgttctaatttctgaagaagggaagcatggcggcgcttagggcgtgttcaaactcgaattacgagggaaacgacggtaaa
 cgtgttatgtgacagaaattgtggctgagagcgttcaattccttgaaccgcgtaattctaagcggcggcggaaataactatcaaggtggcaat
 actaataacaacagtaattataataacgggtggaataactcggacaagcactactaataacgggtgattcgcacaggaccagcaacaatctca
 aatcaaaatfatcaatccaactaacaatgatcctttgcaagtgtgtaagccaatcgcatttctgatgacgatttccatttcaaatcttttagc
 gtttgaactttagataggaggaatttcaatggctggaggacgcagagcggacgccgctggaaaaaagtagttactttacttccaatggtatta
 cgcatatcactataaagatgtagaacttctaaaaatcgttccgaacgtggtaaaatcttaccctgctgtaactggaacaagcgtataatc
 aacgtaaaactactgttctatcaaacgctcacgccaatggctttattaccattgttctgtaagaaaaataaa

aaagggtagaaaacatcgagaaaagtataaaaaacaaaatccaatcggctcaggctccgtaaaaattgtgaaatacaaacagcggaa
 tacgttcccttgaagattcaacgactacttgacggcaaacaaaatggataaagtacttccgaatcacaagaacccaaaacgcagctaat
 agccctgcaaaatggtagaatcaacttaaatccattcaacttctgatagaaacaaagtagagaaagcagcggtaaacattatcacttacc
 cagaaaaatcgttaagctatgcgacatcaacgaaaaccaaccagcacttaaaacaaaagaactcgcgaagcccttcttctgcttgaccgtg

aagaaatcattgatgcggcttacggctcagatgaatacgcaaaaccagctcctcattcctaacagaaaacacgaaatattcacggataaagtag
 aaacatcacgatcaagacattgccaaagcgaaaaaattagtaaaagaaagtggtttgatacaagtcaaaaactaactgtttactatttaacaacag
 taaatcacaagaaagtatcgcgcttacttgcaacaacaatacaagaaatcggcgtgacacttgactgaaaccaacagatccaaatgcactaa
 gcaacattacacttgaccgcaaaaacgcagactattctatcgcgctaaatggttatcatggggaacgatcctgatgcgtataaatccctatacct
 aagcgatgcgcatacaactactgaaactaccacaacaagaatctagatgcacttgggaaaaaggtgctgtaactgcggacgataaagaactg
 caagaaatctatgaaaaatccaaaacacaattgctgatgacgctgtaattatccaatttctatgataatgcagtactcgtcttgatagccgttatg
 gtggacaaaaagctgcaacaccacaaccagtaacaatgtccgtgatcttctaaattatattaacggaataataataaaaatcattcgtgaaaaa
 tctgacctgccatgctgttttggcaggtcagattttactgtcatttttagtgttttagataggagataaattatgtaaaaaacaatcataaacgcgt
 attgcaaatattccgatgctatttattatctcgattattcgtttgcccttatcaaatagcaccggggatcccgtgaattccttgttacgctgatatg
 aatcctgacgatgtagagcggattagacaaagcttagggctggatcaaccaattatgtacaataatttttggcttgaaactgttgcaaggaa
 tcttggttatcgtattgtgaatagccagcagtttgaacaaatttagagagaattccggcgacacttggttgggggaactcgttctgtac
 gctattatcgtattcacttggtttagtggcgcgaattacgaaaaacgtggattgataaagtattaaacgggattt

[0056]

attaagctcgacacaatgtcgaatagctcactgaacaaaacagacggcattaaaaatgtcgaataatcttaacaacgttaccgcgggt
 tagaacgaacaatttgcacatctcgacgccgaacaagcagaacttccgaacgcataaaagaaaaatgtttatgtttgaagatatttctgctt
 gataacatgacctgcaacaagttctggccgaaatcaagacaacaataaaatcgctcgagcacttaaaaatgaaaaagaagaactcaaaagaa
 aatcctatctgcgtatcgaaaaaccgtcgcgatatgattaccgaagaactagaagtccttggcccaatcagacttccgatgttgagcaagccc
 aacaagatatcgcgagtgctgtaaaaaatctagaaaaagcggcaaaatagttatccaacggggggaacaggatgtccttatcaatccgcgaat
 cccaaaaggtaaaagtcactttatccagctgaaaaatggaactgtttatttagatgatatagaagaacagaagaaatcagatcacatattcga
 gaactgacaactagaagtcataaaaaagaactgaaaaacatctatctgcatgaaatagaacaacaaaaatagctaataaaaaagcggc
 actcaagcagaacccaagccattgaggagtaagacgagacgctgaagctgaaatcgaagcaacaacaagctttgaaaaagaaaaa
 cacaaattacctaaactatcaccgatttcttgggatgaaagtattgatctgcagaagaatcgtccaccaagcaatcgcacgcgcaaatga
 agtcttacctatgctaacagaagtcataaaaaactcccagtgcttgcacaaactaaacgtcaccaccaccagaacattaaaagccctaaa
 agaagaaaaacaggcacaaaatcagactggcttttagaaaatcattggaactcgalatgcgactcattacggcgaatttactgtagaaga
 agaaaaggaaactttgactaccgatcaccgaaatttccaacacttcataaacaataatgccgaacggaaaatctaggaggcgataaacgt
 gagctggcgcacaaaaccgaagcttggcaagaataaaaaacaccgtccatacatcaaaaagggaatccacacagtcacaagaacaag
 tctatattccaaaggccctcaagtgaatgggtgacactgcatggcggtaaaataaagtctctgcgaagtaatttctattgaaaaagaaaaa
 aacatgctactcccgttaatacaaacgcacaaagtggcatacgggtgattgggtgtacgtaacggatcgaataacacgattccggccgacgaatt
 cctctcggaaaagtactcaacgcacatccggcgacattttaaagaagaagctgggtatggccaaatttaacaaaaaatgccgctgaagctccac
 caattcatgcttttag

attgacttccacggcttgattttgcaaaaaataaataacattacatccagaaaaacaaacttagtaaaaaccaaagtaccattcaggatca

agcaattggatagaagattatcttacttagaagaaaataataaaaaactataaattagctgaaaaatacataaggtaaaataagctttttcatc
 gcttttttaataaccaggcttaccaggcttttagcaaaaaaccggatattagtagcgaagccggcatatggaaggtgtaaatgtaataataaa
 gtacggcgagccaacataatccgcgataaatgttgaagaaaatggccgaaaacaactaagaaaatacaataaacttggcattatcgaataaa
 cttlcccgcttfaaggcggattgtgcataaaaaacagtcctctctgatctagggtgacaagctattgtatattttaccctagattttgtaacgcttatc
 caacagttaagtaacaaaagatcaaatattaacaacggatgacagctattgcgaatttaagaggacgtgctatcttaggacaataaatcaag
 caggaggagcgatgatatgctaaaacgtcagaaagcatcgccagtcggagaattattataactattgaagatggctgtattatgaatatttctgat
 gataagccaagaaattgggagcttctggatgggaatataatcgaagaggacttttcaagaattaatgatccaactagcaagttatttgaaggcg
 [0057] aaagagagaattttgattgccgatgcttctaaaaggaaccgattttcaaaaaaggtatggcaggcattgagtgaaattccatagggcgtgtgt
 cagctataaagatattgcaatttctgcggggagccctaaagctgtacaagcggtaggacagggcaatcgtgctaatccaattcctatcattattcca
 tgtcataggtgcgtgaaaagtaatggggaacttggggctataacgggacagatgtgataaaaaacaataatttacttgcattagaaaaggcttg
 agtttaagtaactcaagcctttttattacgctgttacttctgtatggtgatttctttgtatcgtttagagttgcaacgagattttcgtctctggttga
 tcaattaaactgtcagcaatagatcttccaggtgctcttggatagtcggcgtagtgccgtgctccaaatttaggatcataaccaagatcaatcaa
 atgttctttacttcttggaaacatcgattgtcacgccttctgagcagcatttcaatgaacgagcattaaatcaataattgtactaaatcgtc
 ttttctagtattaaatcaatgacgctatcaagacggtttaagaattctggttgaagatgcgcctaatttcgaaggatgacagccttttcaa
 gtttagtttctgttgttattaaagccgacagaagcctctgtatctgtcgcaccagcattact

[0058] 实施例2:免疫原的制备及免疫

[0059] 挑取血清型4h的单核细胞增生李斯特菌XYSN于BHI固体平板上3区划线,37°C培养箱静置培养24小时。用PBS收集细菌,8000rpm,2min,洗2遍,调整细菌浓度($OD_{600}=0.8$),沸水浴煮1小时,破坏细菌的H抗原,加入苯酚至终浓度为0.5%,最后超声破碎(振幅50,时间10min)。通过耳静脉免疫成年新西兰大白兔,首次免疫剂量为0.5mL(0.5×10^9 CFU),隔4天免疫一次,共五次,每次增加0.5mL免疫原,PBS作为阴性对照。

[0060] 实施例3:血清抗体效价的检测

[0061] 1. 处理板条:向ELISA板条中每孔加入100 μ L的5%戊二醛溶液(25%戊二醛5mL+0.1M NaHCO₃ 95mL),37°C湿盒作用2小时;

[0062] 2. 取出后用SW洗3遍,每遍5min,拍干ELISA板条;

[0063] 3. 全菌包被:调整XYSN浓度为 1×10^8 CFU/mL,50 μ L/孔包被,置于56°C烘箱烘干20-24小时;

[0064] 4. 次日,每孔加入100 μ L预冷的无水甲醇,室温作用约15min,SW洗3遍,每遍5min;

[0065] 5. 封闭:每孔加入含5%脱脂牛奶溶液进行封闭,200 μ L/孔,37°C水浴2小时,取出后PBST洗3遍,每遍5min;

[0066] 6. 将XYSN多抗血清样品用PBS稀释200倍,混合均匀后向ELISA板条的第一个孔加入200 μ L,混匀,再吸取100 μ L液体小心移至下一孔(已加入100 μ L的PBS),如此连续稀释,至最后一孔均匀混合后吸取100 μ L弃掉,同时设立阴性对照(未免疫)和空白对照(以PBS代替血清样品),37°C水浴2小时;

[0067] 7. PBST洗5遍,每遍5min。加入用含2%BSA的PBST按1:8000稀释的HRP-羊抗兔IgG酶标二抗,100 μ L/孔,37°C水浴1小时;

[0068] 8. PBST洗7遍,每遍5min,尽量拍干残留液体;

[0069] 9. 加入TMB显色液,100 μ L/孔,37°C避光水浴10-15min;

[0070] 10. 加入2M H₂SO₄终止反应, 50μL/孔, 酶标仪检测OD₄₅₀值。

[0071] 血清抗体效价测定结果如图1所示, 当血清稀释到1:409600时, 其P/N=11.10, 大于2.1, 表明此时的兔多抗血清抗体效价大于1:409600, 符合预期要求。

[0072] 实施例4: 4h兔多抗血清的大量制备

[0073] 心脏采血, 4℃静置过夜, 次日6000rpm, 4℃离心10min, 取上清即为4h兔多抗血清, 分装, -70℃保存。

[0074] 实施例5: 玻板凝集鉴定单核细胞增生李斯特菌

[0075] 表1共涉及细菌20株, 其中单核细胞增生李斯特菌血清型4h菌株3株、其它血清型的单核细胞增生李斯特菌12株、伊氏李斯特菌、无害李斯特菌、塞氏李斯特菌、格氏李斯特菌和威氏李斯特菌各1株。

[0076] 表1试验用菌株

序号	中文名	菌株编号	血清型	结果
	单核细胞增生李斯特菌	XYSN	4h	+
	单核细胞增生李斯特菌	15LG	4h	+
	单核细胞增生李斯特菌	16E	4h	+
[0077]	单核细胞增生李斯特菌	EGDe	1/2a	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ113	1/2b	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ114	1/2c	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ115	3a	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ116	3b	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ117	3c	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ118	4a	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ119	4ab	-
	单核细胞增生李斯特菌	NTSN	4b	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ121	4d	-
	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ122	4c	-
[0078]	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ123	7	-
	伊氏李斯特菌	186	伊氏	-
	无害李斯特菌	LBJ131	无害	-
	塞氏李斯特菌	LBJ133	赛氏	-
	格氏李斯特菌	LBJ136	格氏	-
	威氏李斯特菌	LBJ137	威氏	-

[0079] 注:+凝集;-不凝集

[0080] 用PBS将4h兔多抗血清稀释50倍,取5 μ L于载玻片上,分别挑取新鲜的不同血清型的单核细胞增生李斯特菌与多抗血清混匀(菌株见表1),观察凝集反应。

[0081] 结果如表1,图2所示,血清型4h的3株单核细胞增生李斯特菌均与4h兔多抗血清发生明显的凝集反应,其余血清型的单核细胞增生李斯特菌以及伊氏李斯特菌、无害李斯特菌、塞氏李斯特菌、格氏李斯特菌和威氏李斯特菌均不与4h兔多抗血清发生凝集反应,PBS替代兔多抗血清与血清型4h的单核细胞增生李斯特菌XYSN反应作为阴性对照,表明制备的4h兔多抗血清可作为血清诊断试剂盒鉴定血清型4h的单核细胞增生李斯特菌。

[0082] 实施例5:4h兔多抗血清荧光鉴定单核细胞增生李斯特菌

[0083] 1.用PBS收集不同血清型的单核细胞增生李斯特菌(菌株见表1),PBS洗2遍,9000rpm,3min;

[0084] 2.4%多聚甲醛固定20min,PBS洗2遍,9000rpm,3min;

[0085] 3.含5%BSA的PBS于37 $^{\circ}$ C水浴封闭2h,PBS洗2遍,9000rpm,3min;

[0086] 4.将4h兔多抗血清用含5%BSA的PBS稀释800倍,37 $^{\circ}$ C水浴锅作用2小时,PBS洗5遍,每遍5min;

[0087] 5.加入山羊抗兔(Alexa 488),37 $^{\circ}$ C水浴锅作用2小时,PBS洗5遍,每遍5min;

[0088] 6.DAPI 37 $^{\circ}$ C水浴标记细胞核20min,PBS洗4遍,每遍5min;

[0089] 7.取10 μ l与一滴甘油混合,指甲油封片,激光共聚焦观察。

[0090] 结果如图3所示,4h兔多抗血清能很好地标记血清型4h的3株单核细胞增生李斯特菌,在其菌体表面观察到明显的绿色荧光,其余血清型的单核细胞增生李斯特菌以及伊氏李斯特菌、无害李斯特菌、塞氏李斯特菌、格氏李斯特菌和威氏李斯特菌在其菌体表面均看不到绿色荧光,结果表明制备的4h兔多抗血清可成功地标记血清型4h的单核细胞增生李斯特菌。

[0091] 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案,并不能理解为对本发明的限制。此外,本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化,在不脱离本发明的范围和精神的条件下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述,但应当理解,本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上,各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

序列表

<110> 扬州大学

<120> 单核细胞增生李斯特菌血清型4h的血清诊断试剂盒的制备及应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 9228

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

tgaataatag ttgatatttc aagttcttct tectctgaaa acagacggtt accaatttga 60
acttgtacct ctaatttttc accagagtaa gggttttggt tctgatctgc aagcaattga 120
gtagttctt gttgcaactc agatatactt gctttatcac taagaaaaat actaatgcca 180
tcttttgtgc ctttaatttg aacattcttc ttcataacc atttcacccc gcaacattta 240
tactctagcc tttagtatac actaactcaa attaaatgat aataaaaaaa tacttttttt 300
gaaaaaacag ctgaaatcg caagctgtgg atattctcca cagtcatact ttttcaagta 360
atagcgactt caaactgtta aaattacgat agttattctg atttaaccaa acgatcaaga 420
aacaatcgga atgggaaaaa gacaactaaa aagaatgcta aattaatcaa aatggttgtc 480
cataaacgct gatcaataaa aactgggata gacatggttg tcgtaccgat taataataa 540
aacgcatata ctaaactttc tgtaagaata atattaaata tcgcaattaa cccaaccaa 600
agtatattat tttgtaacac tttcataaat ttatctgtga tatacacagt aaacgggaag 660
atagcaaaaat aaatgcccat cacgccagta taataaatat caaacagcaa gcctagaata 720
aaagcatatg ctaaagtcgt atttcgttta taaaacaag tcataatcgt caacataata 780
agtaaaaaat gcggaataaa aagatgtcta tcattaataa gaccattcgc aaactgaaga 840
ctaaaaacac cctctaaaat aaaggttcca accatgattg caggaagtgc aatgtttttc 900
ttaacattca tgattattgg cctccagtcg tgtctgaact agttgtatcg tcatccgtcg 960
tccctgcttc cgctgaacgc ttcaacacag ttacatggtt tagatcatac atgtcagcac 1020
ctggcttaat aaacgcggtt tgagataatc ccattttatc agtttctact ttttcaattg 1080
taccgataaa gatacctgct gggaatttcc caccgagtc agaagtaaca actttctgtc 1140
cttttttaaa tttcatgtca tacggttaatt gttttaattc tagcaactta gtatcactgt 1200
cataaccatt gataatcccg aatgcatttt ccttgcctg cacttttagca gaaacacggt 1260
ttttaacatc cgatgaagtt aataattcaa ctgttggetga ttttagcgct gtcgttggtta 1320
ctttaccaat aagaccactt ggtgttgtaa ctgcatatc aggttttact ccatcacttg 1380
accctttgtc gatttctact tgatcattcc aattagtagg atttctagaa atgacagaag 1440
cattaagtgg atcgtagtcg cgaatactat cagtaatatc aagactttct tttaaatctt 1500
tattttcttt tttcaagtct gcaacttcac tttcaagtga atgtacaata gaagtatata 1560
gattggcggt actaattcca ttaaaaagta gattatcggg ataggtcttt cacagcatct 1620
agactttcct ctaaaaaaaaa gaaaggaaaa aatggggatg atatgataaa aagcaagttt 1680

```

cttttgacaa taattacact ccgagaagcg gaataaaaat gattttttca ctggaaaaca 1740
ttctcctgcg acttgaatga aagacataaa taccgcacta taaatagtta ataaaaagta 1800
aatcatctgt cacctcctag ttgttaaaaa cagaatagca gagacgaaat ttttttgac 1860
atagctaaaa tcacttttcc atcttctatt gcataacaaa aacacctatt ttcattagt 1920
gaaaacaggt gtttttataat attttatctt ctgaaaatcc ttttttagct atttgttctt 1980
ttttatttct cacagtatac tcgatttatt caaaagatta acgtattgag gccacaacaa 2040
atttccgcac ttctgaaatg aaataaagcg atcccgtaat aaagattttc gtattagt 2100
ccgtttcgta aagattat aatgcttggt gccaatctgg attcaaagaa ataccttcat 2160
ttttccctat ttgtattact tcttccgcca tcatagctct aggataatca aaagtagtta 2220
gtattatttc tgcatttggga attgacttta acatcgctaa ctttcttga tagttttat 2280
cagctaatat actcactatt attttcttag gccaggata cttttggacg gaatgagcga 2340
atgttttaat tccttctgga ttatgcgctc catccaacat aataaatgga tttgaaatga 2400
ttttctccat tcgtcctggc caaaatgett tttccaagcc ctttctaatt gccgcaaat 2460
caatttcaaa ggtagaaaat gtatttaagt actgtaatac tttaatagct accgctgcgt 2520
tattcaattg atgcagacca aacagtccaa tggaaagatt gcttatttct tctccataaa 2580
tggttttata ggttatat ccattttcat tatgcatgga aaaagcctta ttcaattggg 2640
taacattaga tttattcttt gttgctatct cagctataac ttcttgagct tctttttgta 2700
tagcacctga aacaactggt atgcccggct taattatgcc agctttttca ctagcaattt 2760
gctcgattgt atccccaagg aattccatgt gatccatccc aattgtggta attacagaaa 2820
ctagtggaac tagaatattc gtagagtcca gtcttccgcc aagtccaact tcgataatac 2880
caatatcgat ggaaacataa tccgcaaac ataaaaacat catagcagta ataatttcaa 2940
attctgaagg tggtcataa acagtttttt ctagctcttc tgcaataggt ttaattcgg 3000
tagctaataga aacaatcatt tcatcgctaa ttggttacc attaacacta attcgttcat 3060
taaaaacttc aatgtagaag tgattagttc agagctttct agaggccgtg ggggaccaag 3120
gtgtatgacg atgccgctt ttagagaaaa tctaaaatag gctttgaaaa atgagaattc 3180
cctttcaaaa tgcgactttc gctaaaagta ttgttggcga ttttaagatg tgctatagt 3240
ttttcaaacc agaattttcg agaaatatct tgctggttag tttgcgctat gatataatat 3300
tttattgtga gtaattataa attattcctt gctcgctctt gattttaagg cttgctaaag 3360
gcagtctgga tttcaaggat atggtatggt tcatgctat atcagagccg cttagacca 3420
caaggaggtg tagagtagat ggctagaaag tacgaaatta tgtacatcat tcgcccac 3480
attgaagaag atgagaaaaa agctgttgta gaacgcttg acggaatctt aactgaaaat 3540
ggtgctggaga tcatcgaatc aaaagaatgg ggtaaagctc gcttagcata cgaaatcaat 3600
gactatcgtg atggttttta ccacatcgtg aaattaaacg ctgataaagc agattctatc 3660
aacgaatttg accgttttagc taaaatttct gatgatatac ttcgtcatat ggtaattaa 3720
gaagaagcat aagaatttat tcaaggctag gaccttgatt tactaaacga gaggaggttg 3780
gttttgcatg atgaatcgtg tagtacttgt aggacgctta acaaaagatc ctgaattacg 3840
ttacactcca gctgggtggt ctgttgcgac ttttacatta gctgtaaatc gcactttcac 3900
taaccaacaa ggagaacgag aagctgactt tattaattgt gttgtttggc gtaaaccggc 3960
agaaaacggt gctaatttcc tgaagaaggg aagcatggcg ggcgttgatg gccgtgttca 4020

aactcgtaat tacgagggaa acgacggtaa acgtgtttat gtgacagaaa ttgtggctga 4080
gagcgttcaa ttccttgaac cgcgtaattc taatggcggc ggcggaaata actatcaagg 4140
tggcaatact aataacaaca gtaattataa taacgggtga aataacttcg gacaagcacc 4200
tactaataac ggtggattcg cacaggacca gcaacaatct caaaatcaaa attatcaatc 4260
cactaacaat gatccttttg caagtgatgg taagccaatc gacatttctg atgacgattt 4320
gccattctaa attcatttta gcggtttgaa ctttaagata ggaggaattt tcaatggctg 4380
gaggacgcag aggcggacgc cgtcggaaaa aagtatgta ctttacttcc aatggtatta 4440
cgcatatcga ctataaagat gtagaacttc ttaaaaaatt cgtttccgaa cgtggtaaaa 4500
ttttacctcg tcgtgtaact ggaacaagcg ctaaataatca acgtaaactt actgttgcta 4560
tcaaacgctc acgccaaaatg gctttattac catttgttgc tgaagaaaaa taaaaggggg 4620
tagaaaacat cgagaaaagt gataaaaaca aaaatccaat cggctcaggt ccgtacaaat 4680
ttgttgaata caaaacaggc gaatacgttt ctttgaaag attcaacgac tactttgacg 4740
gcaaaccaaaa attggataaa gttactttcc gaatcacaaa agaccaaaac gcagctaatt 4800
tagccctgca aaatggtgaa atcaacttaa aatccattca accttctgat agaacaag 4860
tagagaaagc gagcgcggta aacattatca cttaccaga aatcgctta agctatgcga 4920
cattcaacga aaaccaacca gcacttaaat caaaagaact tcgccaagcc ctttcttatg 4980
cgcttgaccg tgaagaaatc attgatgcgg cttacggttc agatgaatac gcaaaaccag 5040
cttcctcatt cctaacagaa aacacgaaat atttcacgga taaagtagaa acatacgatc 5100
aagacattgc caaagcgaaa aaattagtaa aagaaagtgg ttttgataca agtcaaaaac 5160
taactgttta ctatttaaac aacagtaaat cacaagaaag tatcgcgctt tacttgcaac 5220
aacaatacaa agaaatcggc gtgacacttg acttgaaacc aacagatcca aatgcactaa 5280
gcaacattac acttgaccgc aaaaacgcag actattctat cgcgctaaat ggttatatca 5340
tggggaacga tcctgatgcg tataaatccc tatacctaag cgatgcgcca tacaactact 5400
cgaactacca caacaaagat ctagatgcac tttgggaaaa aggtgctgta actgcggacg 5460
ataaagaacg tcaagaaatc tatgaaaaaa tccaaaacac aattgctgat gacgctgtaa 5520
tttatccaat ttcttatgat aatgcagtac tcgctcttga tagccgttat ggtggacaaa 5580
aagctgcaac accacaacca gtaacaatgt tccgtgatct ttctaaatta tatttaacgg 5640
aataataatt aaaaatcatt cgtgaaaaat ctgacctgcc atgcttgttt ttggcaggtt 5700
cagattttta cttgtcattt ttagtgtttt agataggaga taaattatgc taaaacaat 5760
cataaaaacgc gtattgcaaa ttattccgat gctatttatt atctcgatta tttcgtttgc 5820
ccttatcaaa ttagcaccgg gggatcccgt gaattccttt gttacgcctg atatgaatcc 5880
tgacgatgta gagcggatta gacaaagctt agggctggat caaccaattt atgtacaata 5940
ttttatttgg cttggaaaact tgttgcaagg gaatcttggg tattcgattg tgaatagcca 6000
gccagttttg caacaaatth tagagagaat tccggcgaca cttggtttgg tgggaacttc 6060
gcttgttctg acgctattat tatcgattcc acttggttta gttgcggcga attacgaaa 6120
tacgtggatt gataaagat taaacgggat ttattaagct cgacacaatg tcgaatagct 6180
cactgaacaa aacagacggc attaaaaatg tcgcaaatat cttaaacaac gttaccgcg 6240
gtttagaacg aacaatthtc gaacatctcg acgccgaaca agcagaactt tccgaacgca 6300
tcaaagagaa aatgtttatg tttgaagata ttattctgct tgataacatg accttgcaac 6360

aagttctggc cgaaattcaa gacaacaata aaatcgctcg agcacttaaa aatgaaaaag 6420
aagaactcaa agaaaaaatc ctatcttgcg tatcgaaaaa ccgctcgcat atgattaccg 6480
aagaactaga agtccttggc ccaatcagac tttccgatgt tgagcaagcc caacaagata 6540
tcgcgagtgt cgttaaaaat ctagaaaaag acggcaaaat agttatccaa cggggggaac 6600
aggatgtcct tatctaattcc gcgaatccca aaaggtaaag tcaactttatc cgacgtgaaa 6660
atggaactgt tttatttaga tgatatagaa gaaacagaag aaatcgagtc accatattcg 6720
aaagaacttg aacaactaga aagtcaccaa aaagaactcg aaaaacatct atctgccatt 6780
gaaatagaac aacaaaaatt agctaataaa aaagcggcac ttcaagcaga acgccaagcc 6840
attgaggagt taagacgaga cgctgaagct gaaatcgaag caaacaaca agcttttgaa 6900
aaagaaaaaa cacaaattta cctaactatc accgatttcc tttgggatga aagtattgat 6960
ctcgcagaaa gaatcgcca ccaagcaatc gacacgcgc aaattgaagt cttacctatg 7020
ctaacagaag tcatccaaaa actcccagtt gtttcgaca aactaaact caccaccac 7080
ccagaacat taaaagccct aaaagaagaa aacacaggca caaatacga ctggctttta 7140
gaaaatatcc attggaactt cgatatgca ctcgattac gcaatttac tgtagaagaa 7200
gaaaaggaat actttgacta ccgcatcacc gaaattttcc aacacttca taacaaaaat 7260
gccgaacgga aaattctagg aggcgataaa ccgtgagctg gtcgcaaaa accgaagctt 7320
ggcaagaatt aaaaaacacc gtcccataca tccaaaaagg gaaaatccac acagtccaag 7380
aacaagtcta tatttccaaa ggccctcaag tgaaaattgg tgacactgtc atggtcggtg 7440
aaaataaagt gctctgcaaa gtaatttcta ttgaaaaaga aaacaacatg ctactcccgt 7500
ttaatcaaag cgacaaagtg gcatacggtg attgggtgta cgtaacgat acgaaaatca 7560
cgattccggc cgacgaattc ctctcggaa aagtactcaa cgcattccggc gacattttaa 7620
acgaagaagc tggatggcc aaatttaaac aaaaaatgcc gcttgaagct ccaccaattc 7680
atgcttttag attgacttcc acggcttgat ttttgcaaaa ataaataaca ttacattcca 7740
gaaaaacaaa cttagtaaaa accaaagtga ccattcagga tcaagcaatt ggatagaaag 7800
attatcttta cttagaagaa aataataaaa aataactataa attagctgaa aaaatacata 7860
aggtaaaata agctttttca tcgtcttttt taataacca ggcttaccaa agcttttagc 7920
aaaaaaaccg gatattagta cgaaagccgg catatggaag gtgtaaagt aatataaag 7980
tacgcggacg ccaacataat ccgcgataaa tgtttgaaga aaatggcca aaacaactaa 8040
gaaaatcaaa ataaacttgg cattatcga ataaacttcc cgctttaagg cggatttgtg 8100
cataaaaaaa cagtcctctc tgatctaggt tgacaagcta tttgtatatt ttaccctaga 8160
ttttgtaacg cttatccaac agttaagtaa caaaaagtat caaatattaa caacggatga 8220
cagctatttg cgaatttaag agggacgtgc tatcttttagg acaataaatc aagcaggagg 8280
agcgatgata tgctaaaacg tcagaaagca tcgccagtc gagaattatt tataactatt 8340
gaagatggct gtattatgaa ttttcgtat gataagccaa gaaattggga gcttctggat 8400
gggaatataa tcgaaaagga gctttttcaa gaattaatga tccaactagc aagttatfff 8460
gaaggcgaaa gagagaatft tgatttgccg atgcttctaa aaggaaccga ttttcaaaaa 8520
aaggatggc aggcattgag tgaaattcca tatggcgtg ttgtcagcta taaagatatt 8580
gcaatttctg cggggagccc taaagctgta caagcgtag gacaggcga tcgtgctaatt 8640
ccaattccta tcattattcc atgtcatagg tgcgtgaaaa gtaatgggga acttggtggc 8700

tataacggga cagatgttga taaaaaaca tatttacttg cattagaaaa aggcttgagt 8760
ttaagttaac tcaagccttt tttattacgc tgttacttgt tctgttatgg tgatttcttt 8820
gttatcgttt agagttgcaa cgagatTTTT cgcttctggt tgatcaatta aactgtcagc 8880
aatagtatct tccaggtgct cttggatagt ccggcgtagt ggccgtgctc caaatttagg 8940
atcataacca agatcaatca aatgttcttt tacttcttg gaaacatcga ttgtcacgcc 9000
ttcttgagcg agcatttcat ttaagtcaac gagcattaa tcaataattt gtactaaatc 9060
gtctttttct agtgatttaa attcaatgac gctatcaaga cggtttaaga attctggttt 9120
gaagtatgcg cctaatttcg caaggatgtc agagcctttt tcaagtttag tttctgttgt 9180
tgtattaaag ccgacagaag cctctgtatc tgtcgcacca gcattact 9228

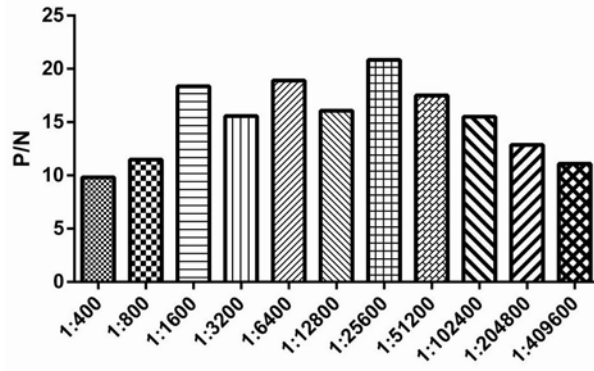


图1

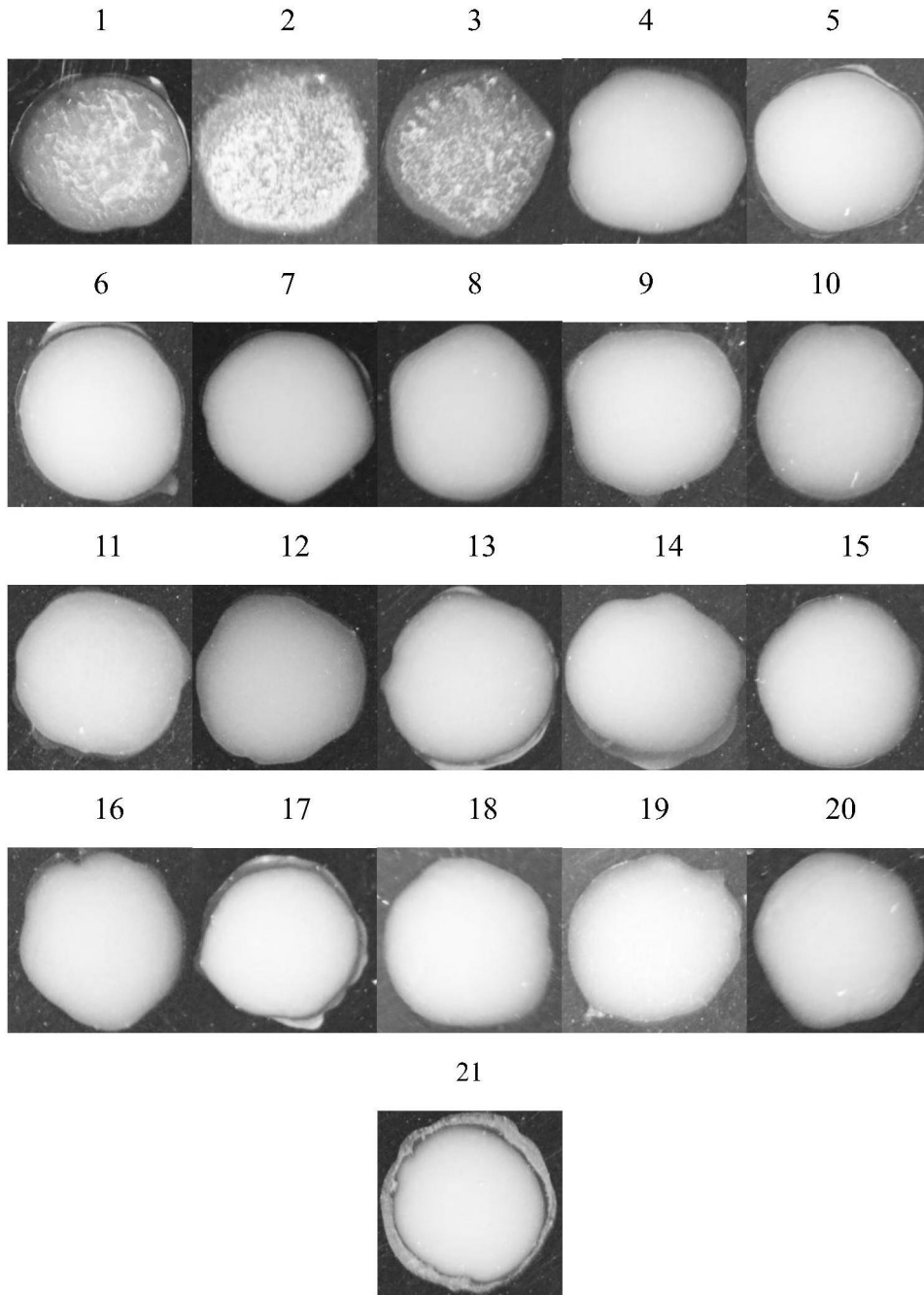
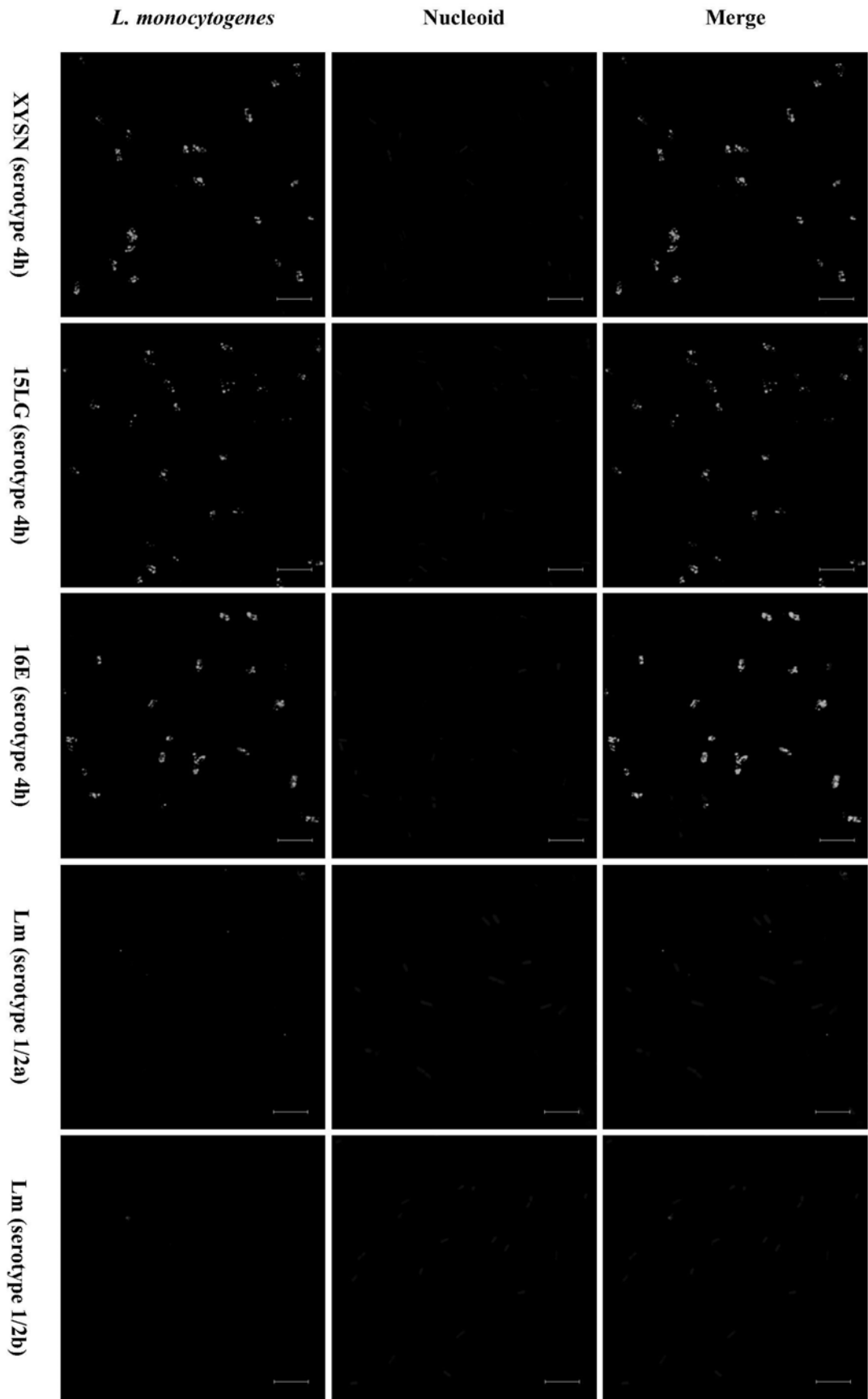
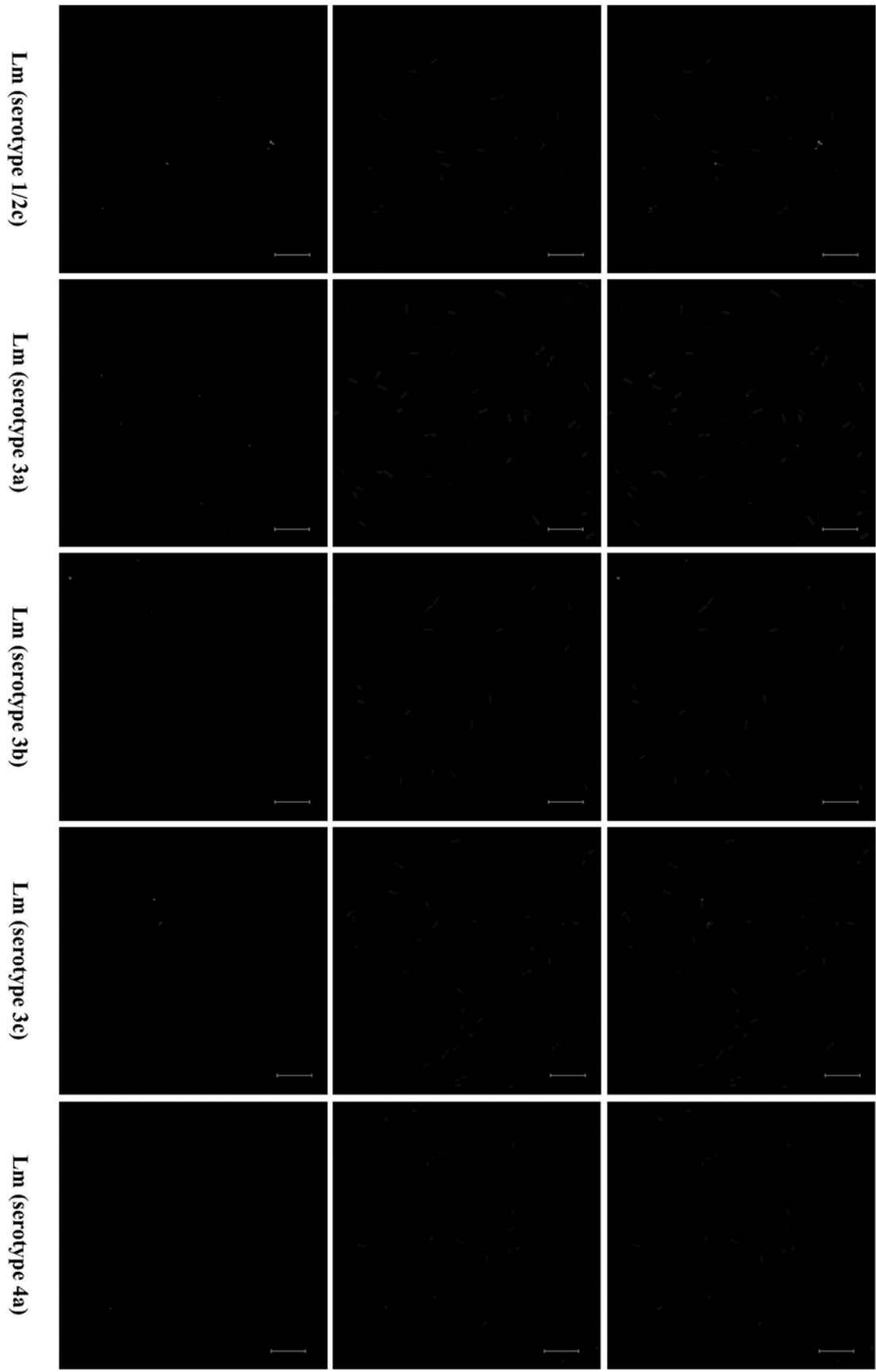
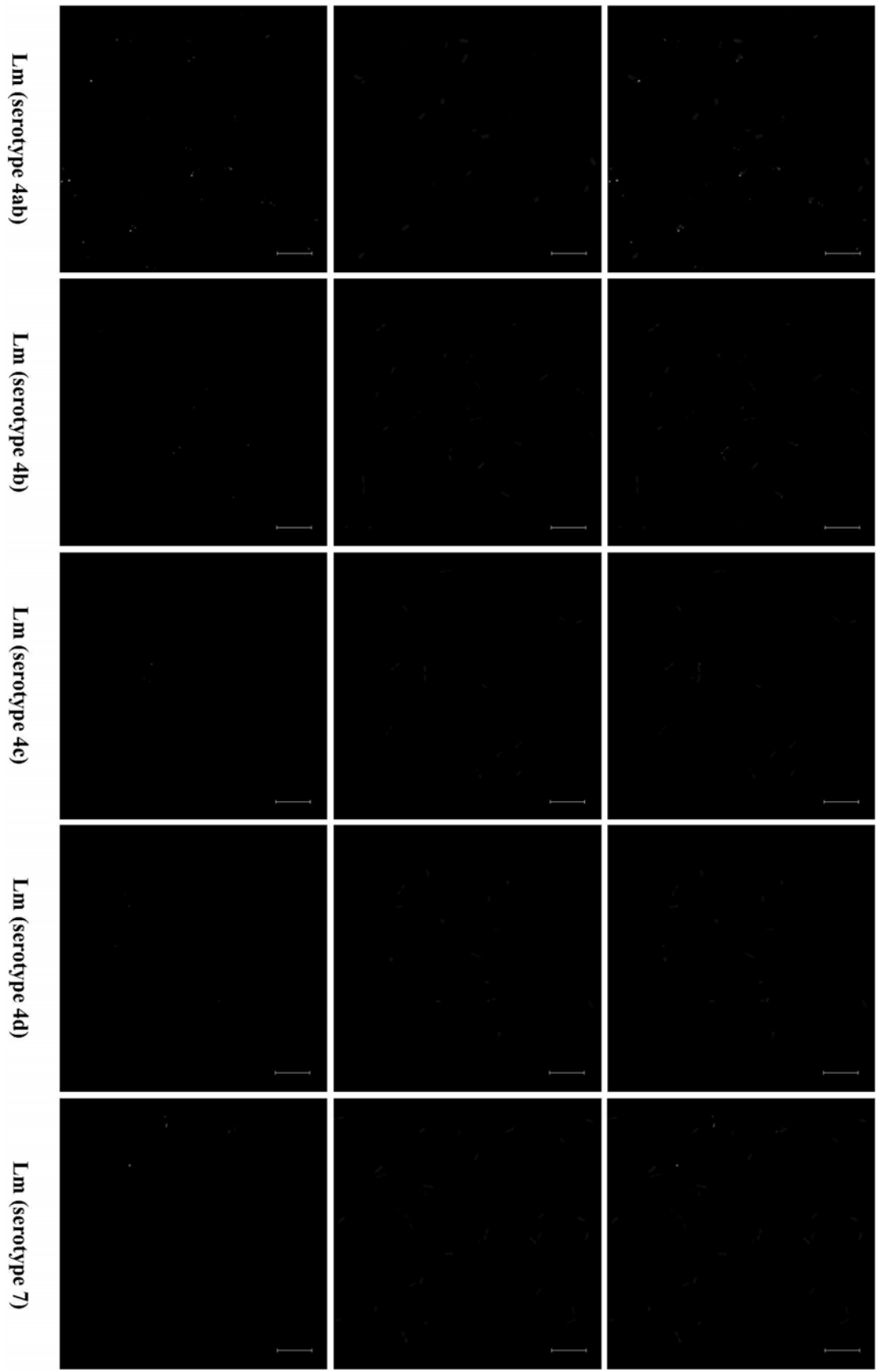


图2







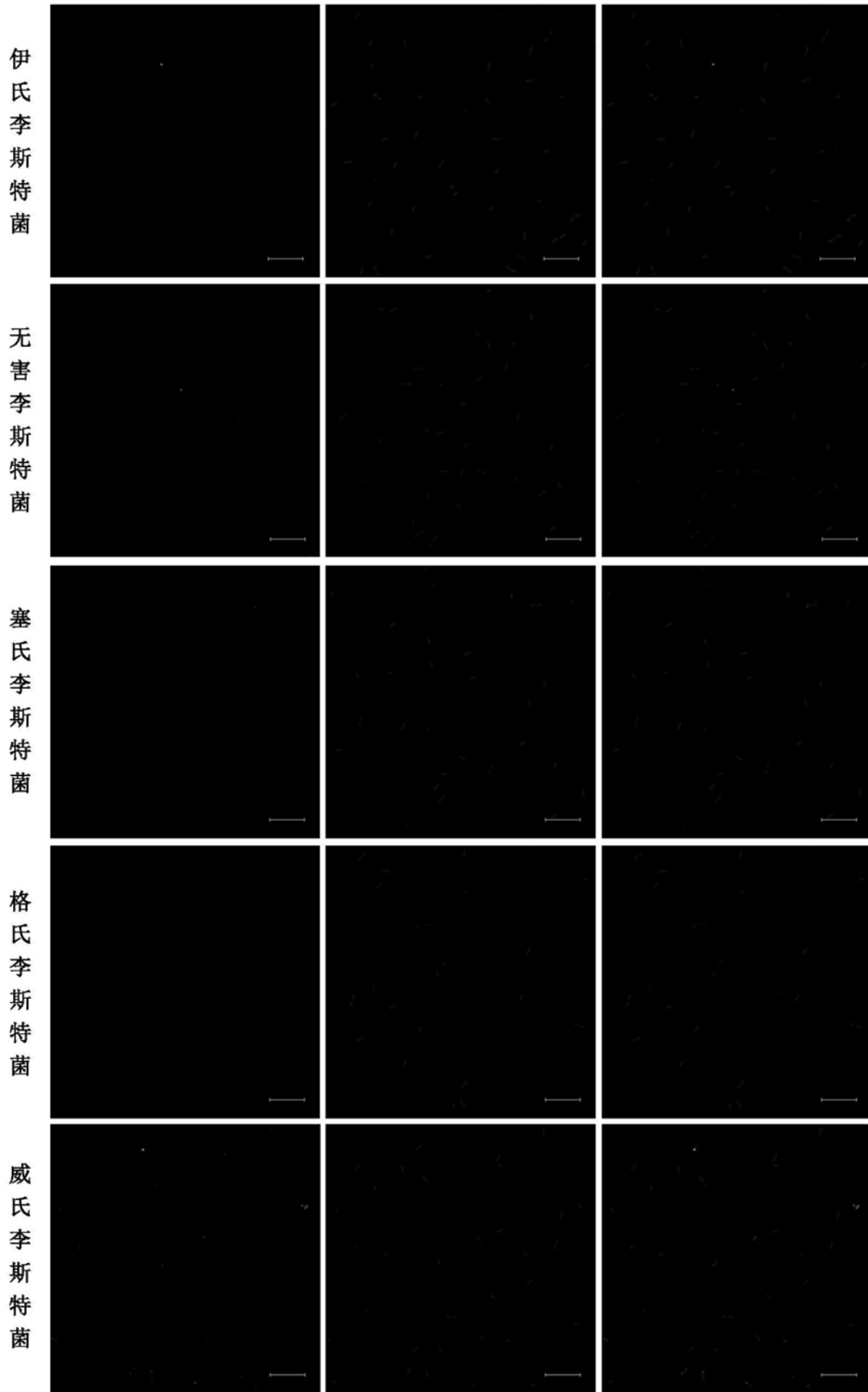


图3