



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—201×

微生物诱变育种致遗传物质损伤强度
测定 Umu 法

Determination of genetic material damage strength for microbial mutation
breeding—Umu method

××××-××-×× 发布

××××-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：清华大学、洛阳华清天木生物科技有限公司、华南理工大学、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：张翀、邢新会、李梅、剪兴金、王立言、郭肖杰、张乐乐、李爽、马爱进。

微生物诱变育种致遗传物质损伤强度 测定 Umu 法

1 范围

本标准规定了用生物遗传毒性(umu)测试方法测定微生物诱变育种致遗传物质损伤强度的方法。
本标准适用于利用 umu 测试法测定诱变育种致微生物遗传物质损伤强度。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

诱变 mutagenesis

通过人为的措施诱导遗传物质产生突变。

3.2

遗传物质损伤 genetic material damage

化学或物理诱变源对遗传物质分子结构的改变。

3.3

应急反应 SOS response

当细胞发生脱氧核糖核酸(DNA)损伤时,产生的一种应激响应机制。

注:在原核生物中主要受应急反应(SOS response)系统调控,调控超过 40 个基因的表达来应对 DNA 损伤。

3.4

遗传物质损伤强度 strength of genetic material damage

化学或物理诱变源对遗传物质分子结构改变程度的大小。

注:由于当细胞受到 DNA 损伤时会发生应急修复(SOS 修复),使其以突变为代价继续存活下去,常用 SOS 修复强弱代表遗传物质损伤强度。

3.5

umu 测试法 umu test

一种将编码 DNA 聚合酶 V 中重要组分的 *umuC* 基因与编码 β -半乳糖苷酶的 *lacZ* 基因融合,导入到鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中,通过检测 β -半乳糖苷酶活性来测定 SOS 的诱导强度的方法。

注:可用于测定遗传物质损伤强度。

4 原理

基于 umu 测试方法,采用荧光素-2-β-D-半乳糖苷作为 β-半乳糖苷酶的荧光底物,利用碘化丙啶作为死细胞染料,通过采用流式细胞荧光分选技术(FACS)测定诱变后活细胞的 β-半乳糖苷酶活性,从而得到活细胞的遗传物质损伤强度。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 1 mol/L 盐酸溶液

量取 83.3 mL 的 12 mol/L 浓盐酸,用水溶解定容至 1 L,得到浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液。

5.2 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取 40.0 g 氢氧化钠,用水溶解定容至 1 L。

5.3 测试微生物培养基(TGA)

称取胰蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)11.9 g,加入 980 mL 水溶解,pH 调整为 7.0±0.2,定容到 1 000 mL。121 ℃,15 min 高压灭菌。溶解 2.0 g 葡萄糖在 20 mL 去离子水中单独灭菌。灭菌后按等比例混合两个溶液,无菌条件下每升冷却的 TGA 培养基中加入 50.00 mg 氨苄青霉素。该溶液可以在-20 ℃保存 4 周。

5.4 荧光素-2-β-D-吡喃半乳糖苷(Fluorescein di-β-D-galactopyranoside,FDG)溶液

在 10 mL 含体积分数为 1%二甲基亚砜(DMSO)和 1%乙醇的水中溶解 13.13 mg FDG,FDG 终浓度为 2 mmol/L,分装后保存在-20 ℃冰箱中。使用前在 37 ℃预热 15 min 以上。

5.5 碘化丙啶(Propidium iodide,PI)溶液

在 10 mL PBS 溶液中溶解 6.68 mg PI,配成浓度为 1 mmol/L 的 PI 溶液。用移液枪吸取 10 μL 浓度为 1 mmol/L 的 PI 储备液,溶于 10 mL PBS 溶液中,配成浓度 1 μmol/L 的 PI 溶液,作为 PI 工作液。于 4 ℃保存,使用前在冰上放置预冷。

6 仪器设备

6.1 恒温水浴锅:温度可实现 37 ℃±1 ℃。

6.2 pH 计,精度 0.1。

6.3 电子天平,精度 0.01 mg。

6.4 高速离心机。

6.5 流式细胞仪。

6.6 恒温震荡摇床,温度可实现 37 ℃±1 ℃,转速范围满足 125 r/min~250 r/min。

6.7 紫外-可见光分光光度计,可检测波长包含 600 nm±20 nm,配备 1 cm 比色皿。

7 样品

7.1 测试微生物

鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* NM2009, 包含表达 *umuC'*-*lacZ* 基因和氨苄青霉素抗性基因的质粒(质粒序列参见附录 A)。

7.2 测试微生物的保存

将 150 试微测试微生物培养物置于冻存管中, 再加入含有 10%(体积分数)二甲基亚砷或 20%(体积分数)甘油的水溶液 350 μ L, 充分混匀后, 保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

8 试验步骤

8.1 测试微生物过夜培养物

测试微生物过夜培养物过程如下:

- a) 在 100 mL 三角摇瓶中装入 20 mL TGA 培养基, 用透气瓶塞封口, 灭菌储存;
- b) 室温融化冻存的测试微生物, 然后在冻存管中加入 1 mL TGA 培养基;
- c) 以 4 000 r/min 转速离心冻存管中的测试微生物 10 min, 然后丢弃上清液, 用 1 mL TGA 培养基重悬测试菌;
- d) 用 0.5 mL 测试微生物重悬液接种到含 TGA 培养基的三角瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中震荡培养过夜(不超过 12 h)。

8.2 准备测试微生物诱变样品和对照样品

用新鲜的 TGA 培养基将过夜培养的测试微生物稀释 10 倍, 继续在 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中震荡培养, 并设定检测波长为 600 nm $\pm$ 20 nm, 以 TGA 培养基作为空白对照, 用 1 cm 比色皿检测培养后测试微生物样品应处于对数生长期。

通过物理诱变或化学诱变等方法对测试微生物样品进行诱变处理得到诱变组, 通过不进行诱变处理得到对照组。测试微生物诱变样品的量宜在 200 μ L 以上, 将诱变处理后的实验组和对照组转移到 1.5 mL 离心管中, 在 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 震荡培养箱中 200 r/min 培养 2 h。

8.3 FDG 和 PI 染色

取诱变组和对照组测试样品 50 μ L 置于 1.5 mL 的离心管中, 在 37 $^{\circ}$ C 预热 5 min 后, 加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 FDG 溶液 50 μ L, 迅速温和混匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中 2 min, 使 FDG 渗透进入细胞。

再向上述 1.5 mL 离心管中迅速加入 500 μ L 的 PI 溶液, 将混合液放置于冰上反应 1 h, 在进行流式细胞测定前应一直将其置于冰上。

8.4 流式细胞仪测定

采用流式细胞仪对染色后样品进行流式分析。设定激发波长为 488 nm, 对于 FDG 水解产物荧光素的荧光强度测定接收波长为 525 nm(FL-1 通道), PI 染色荧光测定接收波长为 670 nm(FL-2 通道)。设定测定细胞总数为 5 000~10 000。

8.5 阈值的设定

通过前向角散射光 FSC 和侧向角散射光 SSC 圈出目标菌体, 以去除多细胞粘连对结果的影响。

通过单独的 PI 染色,测定 FL-1 通道和 FL-2 通道的相对荧光值,在 FL-1 坐标轴上圈出 PI 染色细胞,圈中细胞的 FL-1 通道相对荧光值存在一个范围,FL-1 相对荧光值不小于这个范围的细胞为 PI 染色阴性细胞。

通过单独的 FDG 染色,测定 FL-1 通道和 FL-2 通道的相对荧光值,在 FL-2 坐标轴上圈出 FDG 染色细胞,圈中细胞的 FL-2 通道相对荧光值存在一个范围,FL-2 相对荧光值在此范围内的细胞为 FDG 染色阳性细胞。

对于 FDG 和 PI 同时染色的样品,选取 FDG 染色阳性和 PI 染色阴性的细胞为目标细胞群,用于后续的数据处理和结果分析。

9 试验数据处理

SOS 诱导系数按式(1)计算:

$$F_i = \frac{A_m}{A_{mc}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- F_i ——SOS 诱导系数;
- A_m ——诱变源处理样品的平均 FDG 水解产物荧光素相对荧光值;
- A_{mc} ——对照样品的平均 FDG 水解产物荧光素相对荧光值。

以两个平行样品测定结果的算术平均值报告结果,结果保留至小数点后一位。

附录 A

(资料性附录)

质粒序列信息

鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* NM2009, 包含表达 *umuC'*-*'lacZ* 基因和氨苄青霉素抗性基因的质粒序列信息如下:

```
ccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgcttgcgtggagcgga
cgatgatcggcctgtcgttgcggtattcggaatcttgacgcctcgctcaagecttcgtcactggccccccacaaacgcttcggcgagaagcagg
ccattatcgccggcatggcgccgacgcgtgggctacgtcttctggcgcttcgcgacgcgaggtggatggccttccccattatgattcttctcgtt
ccggcgcatcgggatccccgcttgcaggccatgctgtccaggcaggtagatgacgaccatcaggacagcttcaaggatcgctcgcggtcttac
cagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatccgcctcggcgagcacatggaacgggttgcatggattgtaggcgcgcgc
tataccttgtctgcctccccgcttgcgtcgcggtgatggagccgggccacctgcacctgaatggaagccggcggcacctcgctaacggattacca
ctcaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgcaaaccaaccttggcagaacatatccatcgctccgccatctccagcagcc
gcacgcggcgcatctcgggcagcggttgggtcctggccacgggtgcgcgatgatcgctgctcctgtcgttgaggaccgggctaggtggcggggttgcct
tactggttagcagaatgaatcacggatacgcgagcgaaactgaagcgactgctgctgcaaaacgctcgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcg
gtttccgtgtttcgtaaagtctggaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggtacctgtggaac
acctacatctgtattaacgaagcgctggcattgacctgagtgattttctctggtcccgccgcatccataccgccagttgtttacctcacaaacttcag
taaccgggcatgttcatcatcagtaaacccgtatcgtgagcatcctctctgctttcatcggtatcattacccccatgaacagaaattcccccttacaggag
gcatacaagtacaaaacaggaaaaaacgcccttaacatggcccgtttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacg
cggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctct
gacacatgcagctcccgagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggcgcgctcagcgggtgttggcggggt
gtcggggcgagccatgaccagtcacgtagcgatagcggagtgatatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccata
tgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgctgcgctcggtcgttcggc
tgccggcgagcgggtatcagctcaactcaagcggttaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagc
aaaaggccaggaaacgtaaaaaggccgcttgcgtggcggttttccataggtcctcgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgtcaagtacaggg
tggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctcctcgtgcgtctcctgttccgacctgcgcttaccggatacctgt
ccgcctttctcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgca
cgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgctttagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccac
tggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtgttgccctaactacggctacactagaaggacagtatttgtt
atctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtggttttttgtttgca
agcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagttggaacgaaaactcagcttaaggg
atgttggtcatgagattatcaaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagttttaaatcaatctaagatatatagtaaacttggtctg
acagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgectgactccccgtcgtgtagataactacgatac
gggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagg
gccgagcgcagaagtgtgctcgtcaactttatccgcctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgc
gcaacgttgttgccattgtcgcaggcacgttggtgtcacgctcgtcgttttggtatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatg
atcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcgggtcctccgacgtgtgtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatggttatggcagca
ctgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatggcgcgaccgag
ttgtcttggccggcgctcaacacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtctcatattggaaaacgttcttcggggcgaaaaactctc
aaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaa
aacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaaatactcatacttctcttttcaatattattgaagcatttatcag
gggtattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtatttagaaaaataaacaataaggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtct
```

aagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaagaattccccgggatcccgtcgttttacaacgtc
gtgactgggaaaaccctggcggttacccaacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggccccgaccgatcgc
cttccccacagttgcgcgagcctgaatggcgaatggcgctttgcctgggtttccggcaccagaagcgggtgcccggaaagctggctggagtgcgatcttcc
tgaggccgatactgtcgtcgtccctcaaactggcagcgtcgccagaaggccacgtgagcacaagataagagaacgaaaaatcagcagcctatgcag
cgacaaatattgatagcctgaatcagttatgatctgctggcaagaacagactactgtatataaaaacagtataaactcaggcagattattatgcacggtta
cgatgcgcccactctacaccaacgtaacctatccccattaccggtcaatccgcccgtttgttccccaggagaatccgacgggttggttactcgtcacatttaag
ttgatgaaagctggctacaggaagccagacgcgaattattttgatggcggttaactcggcggttcatctgtggtgcaacggggcgctgggtcggttacg
gccaggacagtcgtttgccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgcggagaaaaaccgectcgcggtgatggtgctgcgttggagtgacggc
agttatctggaagatcaggatatgtggcggtgagcggcattttccgtgacgtctcgttgcgtgcataaacccgactacacaaatcagcgatttccatgttg
ccactcgttttaatgatgatttcagccgcgtgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaaacgatttctttatg
gcagggtgaaacgcaggtcgccagcgccaccgcgcctttcggcggtgaaattatcgatgagcgttggtggttatgccgatcgcgtcacactacgtctga
acgtcgaaaacccgaaaactgtggagcgccgaaatcccgaatctctatcgtgcggttggttgaaactgcacaccgcccagcgacggcacgctgattgaagcaga
agcctgcgatgtcgggtttccgcgaggtgcggattgaaaaatggtctgctgctgctgtaacggcgaagccgttgctgattcgaggcggttaaccgtcacgagc
atcactctctgcatggtcaggtcatggatgagcagacgatggtgcaggatatctcgtgatgaagcagaacaactttaacgccgtgcgtgttccgatt
atccgaaccatccgctgtggttacgcgtgtgcgaccgctacggcctgtatgtggtggatgaagccaatattgaaaccacggcatggtgccaatgaat
cgtctgaccgatgatccgcgtggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgcatcgtaatcaccgagtgatgatcatctggt
cgctgggggaatgaatcaggccacggcgctaatacagacgcgtgtatcgtggatcaaatctgtcgcatacttccccccccggtgcagtatgaaggcgg
cggagccgacaccacggccaccgatattttgccgatgtacgcgcgctggatgaagaccagcccttccccggtgtgcgaaatggtccatcaaaa
aatggcttttcgctacctggagagacgcgcccgcgtgaccttttgcgaatacggccacgcgatgggtaacagtttggcggtttcgtataaactggcagg
cgtttcgtcagtatccccgtttacaggcgcggttcgtctgggactgggtggatcagtcgctgattaaatatgatgaaaaacggcaaccctgtggtcggtt
acggcggtgattttggcgatacgcgaacgatcgccagttctgtatgaacggctggttcttgcgaccgcacgcccatccagcgctgacggaagca
aaacaccagcagcagttttccagttccgtttatccgggcaaacatcgaaagtaccagcgaataacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcact
ggatggtggcgctggatggtaagccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtcgtctccacaaggttaaacagttgattgaactgcctgaactacc
gcagccggagagcgccgggcaactctggctcacagtacgcgtagtgaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatcagcgctggca
gcagtggcgtctggcggaacacctcagttgacgtctcccgcgcgtcccacgccatcccgcactctgaccaccagcgaatggattttgcatcgagct
gggtaataagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagatgtggattggcgataaaaaaacaactgctgacgcgcgtgcgcgatcagtt
caccctgacacgctggataacgacattggcgtaagtgaagcgaccgcattgacctaacgctgggtcgaaactggaagggcgggggccattac
caggccgaagcagcgttgttgagtgacggcagatacacttgcgtgatgcggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaaaacct
tatttatcagccggaacacctaccggattgatggttagtggtaaatggcgattaccgttgatgttgaagtggcgagcgataacccgcatccggcgcg
attggcctgaactgccagctggcgaggttagcagagcgggtaaactggctcggattagggccgcaagaaaaactatcccgaccgecttactgccgct
gttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccgcgtacgtcttcccagcgaaaaacggctcgtcgtcgcggacgcgcgaattgaattatg
gcccacaccagtgggcgcgcgacttccagttcaacatcagccgtacagttcaacgcaactgatggaaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaa
gaaggcacatggctgaatatcgacggtttccatatggggattggtggcgacgactcctggagcccgctcagtatcgcggaattccagctgagcgccg
gtcgtctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaaataataataaccgggcaggccatgtctgccgtatttcgcgtaaggaaatccattatgtactattta
aaaaacacaaacttttggatgttcgggtttattcttttttacttttttatcatgggagcctacttcccgtttttcccgatttggctacatgacatcaacct
atcagcaaaagtatacgggtattatttttggcgtattttctctgttctcgtattattccaaccgctgtttggtctgctttctgacaaactcgggctgcgca
aatactgtctggtgattattaccggcatgttagtgatgtttgcgcggttctttatttttatcttcgggccactgttacaatacaacatttttagtaggatcgat
tgttggtggtatttatctaggcttttgttttaacgcgggtgcgccagcagtagaggcatttattgagaaagtcagccgtcgagtaatttcgaatttggtc
gcgcgcggatgtttggctgtgttggctgggcgctgtgtgcctcgattgtcgccatcatgttaccatcaataatcagtttgttttctggctgggctctgg
ctgtgcactcactctcgccgttttactcttttccgcaaaacggatgcgcctcttctgccacgggttgccaatgcggtaggtgcaaccattcggcattta
gccttaagctggcactggaactgttcagacagccaaaactgtggtttttgtcactgtatgttattggcggttctctgcacctacgatgttttgaccaacagt
ttgctaatttcttacttctgttcttttgcctaccggtgaacagggtacgcgggtatttggctacgtaacgacaatggggcaattacttaacgcctcgattatgt
tctttgcgcactgatcattaatcgcatcggtgggaaaaacgcctctgctgctggtggcactattatgtctgtacgtattattggctcatcgttccgccc

tcagcgctggaagtgggttattctgaaaacgctgcatatgtttgaagtaccgttctctgctgggtgggctgctttaaatatattaccagccagtttgaagtgc
gtttttcagcgacgatttatctgggtctgtttctgcttctttaagcaactggcgatgattttatgtctgtactggcgggcaatatgtatgaaagcatcggtt
tccaggggcgttatctgggtgctgggtctgggtggcgctgggcttcaccttaatttccgtgttcacgcttagcggccccggccccgctttccctgctgctgcg
tcaggtgaatgaagtcgcttaagcaatcaatgtcggatgcggcgcgacgcttatccgaccaacatatcataacggagtgatcgcatgaaacatgccaa
tgaccgaaagaataagagcaggcaagctatttaccgatatgtgcgaaggcttaccggaaaaaagacttcgtgggaaaacgttaatgtatgagtttaate
actcgcatccatcagaagttgaaaaaagagaaagcctgattaaagaaatgtttgccacggtaggggaaaaacgctgggtagaaccgctgtctatttct
cttacgggttccaacatccatatagggccgaatttttatgcaaatttcaatttaaccattgtcgatgactacacggtaacaatcggtgataacgtactgattg
cacccaacgttactctttccgttacgggacacctgtacaccatgaattgagaaaaaacggcgagatgtactcttttcgataacgattggcaataacgt
ctggatcggaagtcatgtggttattaatccaggcgtcaccatcggggataattctgttatttggcgcgggtagtatcgtcacaaaagacattccaccaaac
gtcgtggcggtggtgcttctgttcgggttattcgcgaaataaacgacggggataagcactattatttcaaagattataaagttgaatcgtcagtttaaa
ttataaaaaattgcctgatacgtgcgcttatcaggcctacaagttcagcgatctacattagccgcatccggcatgaacaaagcgcaggaacaagcgtcg
catcatgcctctttgaccacagctgcggaaaacgtactggtgcaaacgcagggttatgatcatcagcccaacgacgcacagcgcgatgaaatgccca
gtccatcaggttaattgccgctgatactacgcagcacgcgcagaaaaaccacggggcaagccccggcgatgataaaaccgattccctgcataaacgccacca
gcttgccagcaatagccggttgacagagtgatcgagcgccagcagcaaacagagcggaacgcgcgccccagacctaacccacacaccatcgccca
caataccggcaattgcatcggcagccagataaagccgcagaacccccaccagttgtaacaccagcgccagcattaacagtttgcccgatcctgatggc
gagccatagcaggcatcagcaaagctcctgcggttggttgcceaagcgtcatcaatgccagtaaggaaccgctgtactgcgcgctggcaccaatctcaatat
agaaagcgggtaaccaggcaatcaggctggcgtaaccgccgttaatcagaccgaagtaaacaccagcgtccacgcgcggggagtgataaccagc
gaaccggagtggttgttcttgtgggaagaggcgacctcggggcgctttgccaccaccaggcaaaagagcgcaacaacggcaggcagcgccacca
ggcgagtggttgataaccaggtttcgtatgttgaaactaaccagggcggttatggcggcaccaagcccaccgccgcccatcagagccgcggaccacagcc
ccatcaccagtggcgtgcgctgctgaaaccgccgtttaatcacgaagcatcaccgcctgaatgatgccgatccccacccaccaagcagtgcgctgct
aagcagcagcgcaactttgcgggttaaagctcacgcatcaatgcaccgacggcaatcagcaacagactgatggcgacactgcgacgttcgctgacatgct
gatgaagccagcttccggccagcgcagccccgccatggtaaccaccggcagagcggtaa