



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 饲料添加剂中产朊假丝酵母的测定

Determination of *Candida utilis* in microbial feed (*Candida utilis* 无法修改成斜体)

征求意见稿

草案版次选择

(本草案完成时间：)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：山东宝来利来生物工程股份有限公司、安琪酵母股份有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、浙江科峰生物技术有限公司、唐山拓普生物科技有限公司。

本文件主要起草人：谷巍、单宝龙、徐海燕、辛国芹、汪祥燕、亓秀晔、覃先武、刘雪莲、章亭洲、周雪玲。

# 饲料添加剂中产朊假丝酵母的测定

## 1 范围

本文件描述了饲料添加剂中产朊假丝酵母的检验方法。

本文件适用于饲料添加剂产朊假丝酵母和含有产朊假丝酵母的混合型饲料添加剂的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯。

4.1 水：GB/T 6682，三级。

4.2 0.85%灭菌生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠，加少量蒸馏水溶解，然后用蒸馏水稀释至 1000 mL，121 °C 灭菌 30 min。

4.3 孟加拉红琼脂培养基：按附录 A.1 配制。

4.4 糖发酵试验培养基和试剂：按附录 A.2 配制。

4.5 碳源利用试验试剂：按附录 A.3 配制。

4.6 分子生物学检测方法：见附录 B。

## 5 仪器设备

5.1 恒温培养箱：精度为 28 °C ±1 °C。

5.2 电子天平：精度 0.01 g、0.0001 g。

5.3 光学显微镜：400~1000 倍。

5.4 恒温水浴锅：精度为 1 °C。

5.5 拍击式均质器及无菌均质袋。

- 5.6 漩涡混合器。
- 5.7 无菌吸管：容量为 1 mL（具 0.01 mL 刻度）、容量为 10 mL（具 0.1 mL 刻度）。
- 5.8 无菌试管：20 mm×200 mm。
- 5.9 微量移液器及吸头：10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1.0 mL。
- 5.10 无菌锥形瓶：容量为 250 mL、500 mL。
- 5.11 无菌平皿：直径 90 mm。
- 5.12 涂布棒。

## 6 样品的采集

以微生物检测为目的的采样按照 GB/T 42959 执行，以其它检测指标为目的的采样按照 GB/T 14699.1 执行。

## 7 试验步骤

### 7.1 样品稀释

无菌操作准确称取样品 25.0 g 或以无菌吸管吸取 25 mL，置于装有 225 mL 0.85% 灭菌生理盐水的 500 mL 无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分振摇 10 min~15 min；或放入装有 225 mL 的 0.85% 灭菌生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 初始稀释匀液。用无菌吸管或微量移液器吸取初始稀释匀液 1 mL 于含 9 mL 的 0.85% 无菌生理盐水试管中（试管尖端不要触及稀释液），在漩涡混合器上混匀，即得 1:100 稀释匀液。根据样品含菌量，按上述步骤做进一步的十倍系列递增稀释。每递增稀释一次，更换一次 1 mL 无菌吸管或吸头。

### 7.2 接种和培养

选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品稀释匀液，每个稀释度分别吸取稀释匀液 0.1 mL 接种于 2 个孟加拉红琼脂平皿内（4.3）。同时分别吸取 0.85% 无菌生理盐水 0.1 mL 于 2 个孟加拉红汁琼脂平皿内作空白对照。使用无菌涂布棒尽可能小心快速地将接种物涂布均匀。注意：尽量避免将接种物涂布到平皿边缘。涂布结束后需将涂布棒灼烧灭菌或更换无菌涂布棒，再进行下一个样品的涂布操作。涂布完成，将平皿静置 10 min 使接种物完全被培养基吸收。翻转平皿置于 28  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中，培养 72 h  $\pm$  2 h。

### 7.3 菌落形态

培养后观察菌落形态，典型产朊假丝酵母菌落平坦，表面湿润，菌落表面中心呈白色或很浅的淡红色，边缘整齐。

### 7.4 菌落计数

培养完成，观察菌落形态，选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平皿计数菌落总数。每个稀释度的菌落数应采用两个平皿的平均数。

## 8 确证试验

## 8.1 菌种制备

自计数平皿上挑取3个~5个特征菌落，划线转接培养于孟加拉红琼脂培养基（4.3）平皿上，28℃±1℃培养72h后，进行确证试验。如有必要可2℃~8℃保存14天。

## 8.2 镜检

挑选8.1培养的单菌落，于400倍光学显微镜下观察菌落形态。产朊假丝酵母细胞为椭圆形，大小为（3.5~4.5）μm×（7.0~13.0）μm，以多边出芽方式进行无性繁殖。

## 8.3 生理生化鉴定

### 8.3.1 生理生化确证

将挑选纯化的菌落进行糖发酵试验（4.4）、碳源利用试验（4.5）。

### 8.3.2 结果判定

产朊假丝酵母的生理生化特征见表1。

表1 产朊假丝酵母的生理生化特征

试验项目		结果	试验项目		结果
糖类发酵	葡萄糖	+	碳源利用	D-葡萄糖	+
	蔗糖	+		D-木糖	+
	麦芽糖	-		纤维二糖	+
	半乳糖	-		蔗糖	+
	乳糖	-		松三糖	+
	海藻糖	-		D-山梨醇	+
注：+表示阳性反应；-表示阴性反应；					

## 8.2 分子鉴定

采用核酸序列分析法对菌株rDNA基因中26S rDNA D1/D2区和转录间区ITS序列保守性进行分析。扩增菌株26S rDNA D1/D1区和ITS基因并进行序列测定，与产朊假丝酵母*Candida utilis* CICC1314序列进行同源性比较，两者一致性高于99%，则该菌株为产朊假丝酵母*Candida utilis*。按照附录B进行。

## 9 试验数据处理

9.1 若只有一个稀释度平皿上的菌落数在10 CFU~150 CFU之间时，计算两个平皿菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为1g（mL）样品中酵母菌总数结果。

9.2 若有两个连续稀释度的平皿菌落数在10 CFU~100 CFU之间时，按式（1）计算，即为1g（mL）样品中的产朊假丝酵母菌数  $N$ ：

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$N$ ——样品中产朊假丝酵母菌落数；

$\Sigma a$ ——适宜稀释度平皿产朊假丝酵母菌落数的总和；

$n_1$ ——第一个稀释度（低稀释倍数）平皿个数；

$n_2$ ——第二个稀释度（高稀释倍数）平皿个数；

$d$ ——稀释因子（第一稀释度）

9.3 若所有平皿上菌落数均小于 10 CFU 或者均大于 150 CFU，则应当重做。

## 10 试验报告

10.1 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 CFU 以内时，采用一位有效数字报告；菌落数在 10 CFU~100 CFU 之间时，采用两位有效数字报告。

10.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。

10.3 若空白对照平皿上有菌落出现，则此次检测结果无效。

10.4 报告单位以 CFU/g (mL) 表示，报告产朊假丝酵母活菌数。

附 录 A  
(规范性)  
产朊假丝酵母检测方法

### A.1 孟加拉红琼脂培养基

A.1.1 孟加拉红琼脂培养基成分及含量见表A.1。

表A.1 培养基成分及含量

成分	含量
蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
无水硫酸镁	0.5 g
琼脂	20.0 g
孟加拉红	0.033 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

将上述成分加于蒸馏水中，充分溶解，补足蒸馏水1000 mL，自然pH，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌15 min~20 min，避光保存备用。

### A.2 糖发酵试验

产朊假丝酵母菌种对糖的发酵试验采用杜氏管（Durham tube）法。

#### A.2.1 糖发酵底物

葡萄糖（glucose）、蔗糖（sucrose）、乳糖（lactose）、半乳糖（galactose）、麦芽糖（maltose）、和海藻糖（trehalose），所用化合物均为分析纯。

#### A.2.2 糖母液制备

准确称取 A.2.1 所用糖发酵底物，用蒸馏水配成 20%（w/v）母液，过滤除菌后置 4 °C 下备用。

#### A.2.3 糖发酵培养基制备

用蒸馏水配制 0.5%（w/v）酵母提取物（Yeast Extract）溶液，取 3.6 mL 分装于口径 12 mm 试管中，放入倒置的发酵管，用棉塞封口后 115 °C 灭菌 30 min，冷却后每个试管内无菌加入 0.4 mL 糖母液备用。

#### A.2.4 酵母菌种子液制备及接种

将待测酵母菌划线接种于麦芽汁琼脂培养基，28 °C 培养 2 d~3 d 进行活化，再转接于 YPD 培养基中，于 28 °C 培养 24 h，添加适量无菌蒸馏水，制成细胞悬浮液  $A_{640} \approx 1.0$ ，此时细胞数约为  $10^7$  CFU/mL，以每试管 0.1 mL 的量接种于准备好的发酵试管内，摇匀。

#### A.2.5 培养及观察记录

25 °C 恒温培养箱培养两周，期间观察杜氏管内是否有气体积存及其积存量，第一周内每天记录一次，第二周内每 2 d~3 d 记录一次，最后记录结果如表 A.2 所示。

表A.2 酵母菌糖发酵观察符号及结果释义

序号	观察结果	释义
----	------	----

1	+	强发酵，7 d 内气体迅速充满倒置管；
2	L	延迟发酵，7 d 后倒置管才迅速充满气体；
3	W	弱发酵，倒置管内有气体，但直到最后也未充满；
4	—	不发酵，倒置管内无气体积存；
5	V	同一种内有的菌株发酵，有的不发酵或弱发酵。

### A.3 碳源利用实验

#### A.3.1 碳源化合物选择

选用以下6种碳源化合物作为同化试验对象。所用化合物均为分析纯。

表A.3 碳源名称及成分

碳源	成分
六碳糖	D-葡萄糖 (D-glucose)
五碳糖	D-木糖 (D-xylose)
双糖	蔗糖 (sucrose)、纤维二糖 (cellobiose)
三糖	松三糖 (melezitose)
多糖	可溶性淀粉 (soluble starch)
醇类	D-山梨醇 (D-sorbitol)

#### A.3.2 制备碳源同化母液

把各种碳源分别配成10倍葡萄糖浓度的同化母液，具体方法为：称取6.7 g酵母含氮基础培养基 (Yesat Nitrogen Base)，加入与5.0 g葡萄糖相当的碳源化合物（即与5.0 g葡萄糖含有等摩尔的碳），溶于100 mL蒸馏水中，过滤除菌后放入4 °C冰箱作为同化母液备用。

#### A.3.3 制备同化管

在12 mm口径试管中每管加入3.6 mL蒸馏水，121 °C灭菌30 min后加入0.4 mL同化母液制成同化管备用。

#### A.3.4 接种及培养

按附录A.2.4把培养24 h~48 h的产朊假丝酵母菌体用无菌水制成细胞悬浮液，然后用无菌移液器吸50 μL细胞悬液滴入同化管内，混匀，25 °C下静置培养1周、2周和4周，分别记录结果。

#### A.3.5 结果观察

同化结果的观察与记录方法：取一片白色卡片，其上用墨汁或黑色墨水划上约0.75 mm宽的直线，把培养一段时间后的同化管充分摇匀，贴于该卡片上，透过培养液观察卡片上的黑线，并根据表A.3原则记录：

表A.3 产朊假丝酵母碳源同化结果观察符号及释义

序号	观察结果	释义	同化结果
1	+++	透过试管完全看不见黑线；	“+”强同化，两周内为++或+++；“L”延滞同化，两周后迅速变为++或+++；
2	++	可见黑线但呈一发散的模糊线条；	“S”缓慢同化，两周后缓慢变为++或+++；“W”弱同化，记录为+；“-”不同化；“（+）”少数情况可以同化；
3	+	黑线可见但边缘模糊	“V”有些菌株同化反应为+，有些菌株同化反应为-；
4	-	黑线清晰可见且边缘不模糊	“+/W”可以同化或弱同化，所有菌株都可以生长，有些生长较弱；“W/-”弱同化或不同化。



## 附录B (规范性)

### 产朊假丝酵母分子生物学检测

#### B.1 原理

rDNA 是编码核糖体 RNA 的基因，通过 PCR 技术和荧光染色技术结合可以准确定位基因位置，其测定序列常用来鉴定物种同源性。其中 26S rRNA 是核糖体 RNA 的一个亚基，而 26S rDNA 是编码该亚基的基因，26S rDNA 的 D1/D2 区域位于大亚基的 5'端，序列长度在 600 bp 左右，这段区域具有较高的变异率，同种酵母菌的碱基差异率一般小于 1%，不同菌株的碱基差异率大于 1%，可用于亲缘关系较近的菌株间的分类研究。ITS (internal transcribed spacer) 区域为转录间区，位于 18S rDNA 和 26S rDNA 之间。ITS 区域与 rDNA 转录区相比具有较高的变异率，对于亲缘关系较近的菌株间的区分是比较有效的，常常与其他序列相结合，应用于酵母菌分类系统学研究中。采用 26S rDNA 和 ITS 区序列扩增，用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，并对 PCR 产物进行测序，与产朊假丝酵母 *Candida utilis* CICC1314 序列进行比对，判定是否为产朊假丝酵母。

#### B.1 试剂和材料

##### B.2.1 DNA 提取

利用商业化酵母基因组提取试剂盒（天根生化科技有限公司，DP307）对产朊假丝酵母培养物提取 DNA，作为模板。

##### B.2.2 PCR 扩增

###### B.2.2.1 引物序列

采用 26S rDNA D1/D2 区的 5'端通用引物(NL1)和 3'端通用引物(NL4)扩增菌株 26S rDNA D1/D2 区序列；ITS 保守区 5'端通用引物 (ITS1) 和 3'端通用引物 (ITS4) 扩增菌株 ITS 特异性序列，引物序列如表 B.2。按引物序列合成引物，加入超纯水配成 10 μmol/L，贮存于-20 °C。

表B.2 引物序列

引物名称	序列 (5'-3')
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

B.2.2.2 dNTPs: dNTPs 由 2.5 mmol/L 等量的 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 混合而成，贮于-20 °C。

B.2.2.3 10×PCR 缓冲液: 100 mmol/L KCl, 160 mmol/L (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1% TritonX-100, 1 mg/mL BSA, 贮存于-20 °C。

B.2.2.4 TaqDNA 聚合酶: 5 U/μL 贮存于-20 °C。

##### B.2.3 琼脂糖凝胶电泳

B.2.3.1 琼脂糖: 电泳级。

B.2.3.2 10 mg/mL 溴化乙锭溶液。

B.2.3.3 DNA 分子量标准: 100 bp~2000 bp。

B.2.3.4 电泳缓冲液: 242 g Tris 碱, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 加蒸馏水至 1000 mL, 使用时 10 倍稀释。

B. 2. 3. 5 加样缓冲液：0.25%溴酚蓝，40%蔗糖。

### B. 3 仪器

B. 3. 1 离心机。

B. 3. 2 -20℃冰箱。

B. 3. 3 PCR 仪。

B. 3. 4 核酸电泳仪。

B. 3. 5 移液器：2 μL、10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL。

B. 3. 6 凝胶成像系统。

### B. 4 操作步骤

#### B. 4. 1 样品 DNA 提取

B. 4. 1. 1 取酵母细胞（最多不超过  $5 \times 10^7$  cells），12,000 rpm 离心 1 min，尽量吸除上清。

B. 4. 1. 2 酵母细胞壁的破除：向菌体中加入 600 μL 山梨醇 buffer，加入 50 UL yticase，充分混匀。30 °C 处理 30 min。4000 rpm 离心 10 min，弃上清，收集沉淀。

B. 4. 1. 3 向沉淀中加入 200 μL 缓冲液 GA 重悬沉淀，充分混匀。

B. 4. 1. 4 加入 20 uL 蛋白酶 K 溶液，混匀。

B. 4. 1. 5 加入 220 uL 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70 °C 放置 10 min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

B. 4. 1. 6 加 220 uL 无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

B. 4. 1. 7 将上一步所得和状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm（ $\sim 13,400 \times g$ ）离心 30 s，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。

B. 4. 1. 8 向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 30 s，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。

B. 4. 1. 9 向吸附柱 CB3 中加入 700 μL 漂洗液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 30 s，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。

B. 4. 1. 10 向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 漂洗液 PW，12000 rpm 离心 30 s，倒掉废液

B. 4. 1. 11 将吸附柱 CB3 放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

B. 4. 1. 12 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 uL~200 uL 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2 min~5 min，12000 rpm 离心 2 min，将溶液收集到离心管中，即得酵母菌 DNA 模版。

#### B. 4. 2 PCR 扩增

##### B. 4. 2. 1 试验对照的设立

每个样品应有两个平行，同时每次检测必须设立对照。

--分子量标准：DL2000。

--空白对照（不含 DNA 模板）。

#### B.4.2.2 PCR 扩增的反应体系

检测产朊假丝酵母的 PCR 反应体系见表 B.3。

表 B.3 检测产朊假丝酵母 PCR 反应体系

反应体系	加样体积 (μL)
10×buffer	5.0
dNTP Mixture (each 2.5 mM)	4.0
Primer1 (25 μM)	1.0
Primer2 (25 μM)	1.0
模板 DNA	2.0
Taq DNAase (5 U)	0.5
ddH <sub>2</sub> O	36.5
Total	50

#### B.4.2.3 PCR 扩增的反应程序

检测产朊假丝酵母的 PCR 扩增反应程序见表 B.4。

表 B.4 检测产朊假丝酵母的 PCR 扩增反应程序

PCR		反应程序	
温度 (°C)	时间 (min)		
94.0	2	预变性	
94.0	1	变性	扩增 (30 个循环)
60.0	1	退火	
72.0	1	延伸	
72.0	10	延伸	

#### B.4.3 琼脂糖凝胶电泳

在电泳缓冲液中加入 1% (W/V) 琼脂糖，加热融化后加入溴化乙锭制备凝胶，凝固后进行电泳。5 μL PCR 产物加入 2 μL 5×上样缓冲液，混匀后加入上样孔，80 V 恒压电泳 20 min~40 min，凝胶成像系统检测结果。

#### B.4.4 PCR 产物送测

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，在目的片段位置出现条带，送测序公司进行测序。

### B.5 结果及判断

#### B.5.1 试验结果成立条件

样品产朊假丝酵母基因组 DNA 经 NL1/NL4 和 ITS1/ITS4 进行 PCR 反应扩增 500 bp~750 bp 的特征片段，空白对照经 NL1/NL4、ITS1/ITS4 分别进行 PCR 扩增后均无条带出现，试验结果成立，进行 PCR 产物进行测序；否则，结果不成立，不进行送测。

#### B.5.2 结果判断

在试验结果成立的前提下，如果样品中 rDNA 基因经 NL1/NL4 进行 PCR 后出现 615 bp、经 ITS1/ITS4 进行 PCR 后出现 565 bp 的特征片段，且测序结果与 GenBank 等国际核酸序列数据库中 *Candida utilis* 序列一致性≥99%，表明样品 rDNA 基因 26S、ITS 区内具有产朊假丝酵母特征 DNA 片段，可判定为

产朊假丝酵母。

#### B.6 废弃物处理和防止污染的措施物

检测过程中的废弃物，应收集后进行无害化处理。

#### B.7 模式菌株产朊假丝酵母序列

模式菌株产朊假丝酵母 CICC1314 ITS 序列如下：

```
TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAGAACCTGGGCCTGCGCTTCTAGCGCGGCTCCA
ACCAATACACAGTGTATTTTGCTTCTTTTGCTTTGGCTCTGCCAAAGGTTTTAAACACAGAAATTT
ATTTTCTCTAGAACTAGTCAATTTGAATTTAATCTTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGGTTTTCGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTCTGGCATTCCAGAGAGCATGCCTGTTTGAGCGTCATT
TCTCTCTCAAGATCCTCTAGGGGACTTGGTATTGAGTGATACTCTGTGTAACTTGAAATACTCTA
GGCAGAGCTCCCCCTAGAAATCCTCTGGGCCGAAATAATGTATTAGGTTCTACCAACTCGTTATT
TTCCAGACAGACTTCCAGGCAGAGCTCGGCTGAACAACCTTTCTAAGCTTGACCTCAAATCAGGT
AGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
```

26S 序列如下：

```
CAATAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAG
CTCAAATTTGAAATCTGAGGCTCTCAGCCCCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTGTCTGGCGCCG
GCCCCCTGTCTACGTTCTTGGAACAGGACATCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGCGGGGCG
GCCTGGCTCCGTGTAGAGCGCCATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG
GTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAA
GATGAAAAGAACCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATT
GGATCAGACTTGGTGTCTGTGCGAATAGCGGCTCTTCTTGGGCCGCCACTCGCACTCCACCGGGC
CAGCATCGTTTTGGGCGGCAAGACAATGGCGGGGGAACGTGGCACTGCTCTCGGGCAGTGTGTT
TATAGCCCCGCTGATGTTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCTGGCGT
AATGATCCAACACCGCCCGTCTTGAACCACGGGACCA
```