



中华人民共和国国家标准

GB/T 40049—2021

鸡肠炎沙门氏菌 PCR 检测方法

PCR detection method of chicken salmonella enteritis

2021-04-30 发布

2021-11-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SC/TC 181)归口。

本标准起草单位：山东农业大学、青岛农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、山东省农业科学院家禽研究所、秦皇岛海关、山东派克检测技术有限公司。

本标准主要起草人：常维山、孙淑红、王述柏、翟海华、崔言顺、柴同杰、鞠孜敬、赵效南、王涛、黄兵、宋敏训、马秀丽、高月花、郑德云、郭树源、马洪超、孙杰、张富友。



鸡肠炎沙门氏菌 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了鸡肠炎沙门氏菌分子分型的 PCR 检测方法。

本标准适用于各种日龄的鸡及其产品中携带的肠炎沙门氏菌的 PCR 方法检测。

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 4789.4—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 28642—2012 饲料中沙门氏菌的快速检测方法 聚合酶链式反应(PCR)法

NY/T 541—2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

持家基因 house-keeping gene

生物体在生理、病理和不同发育阶段的在所有类型的细胞中都表达的一类基因。这类基因高度保守,基因产物对于维持细胞的基本结构和代谢功能是必不可少的。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

5 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯。实验用水均符合 GB/T 6682—2008 二级水规定。

5.1 LB 液体培养基(配制方法见附录 A 中 A.1)。

5.2 缓冲蛋白胨水(BPW)前增菌液(配制方法见 A.2)。

5.3 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液(配制方法见 A.3)。

5.4 四硫磺酸盐煌绿(TTB)增菌液(配制方法见 A.4)。

5.5 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂 D.3(配制方法见 A.5)。

5.6 TAE 电泳缓冲液(配制方法见 A.6)。

5.7 阳性、阴性对照:阳性对照为肠炎沙门氏菌标准株(CVCC3377)培养液、鸡白痢沙门氏菌标准株

(CVCC535)培养液;阴性对照为灭菌超纯水。

- 5.8 细菌基因组 DNA 提取试剂盒:商品化试剂盒。
- 5.9 无水乙醇:—20 °C 预冷。
- 5.10 75% 乙醇:无水乙醇和双蒸水配制,—20 °C 预冷。
- 5.11 DNA 分子量标记:DNA Marker 2 000。
- 5.12 琼脂糖。
- 5.13 七个持家基因片段的 PCR 引物序列:参见附录 B 的 B.1。
- 5.14 2×PCR Mix。

6 仪器

- 6.1 恒温培养箱(温度范围:5 °C ~ 50 °C,温度均匀度:≤ ±1 °C)。
- 6.2 高压灭菌锅(灭菌温度:105 °C ~ 135 °C,工作压力:≤ 0.35 MPa)。
- 6.3 电子天平(感量 0.001 g)。
- 6.4 高速离心机(可控温至 4 °C、离心速度可达 12 000 r/min 以上)。
- 6.5 二级生物安全柜。
- 6.6 4 °C 冰箱(温控范围 2 °C ~ 8 °C);—20 °C 冰箱。
- 6.7 PCR 仪。
- 6.8 电泳仪(电压 90 V ~ 120 V)。
- 6.9 微量移液器(2 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL)及配套吸头。
- 6.10 电泳仪(电压 90 V ~ 120 V)。
- 6.11 控温摇床(温度范围:5 °C ~ 50 °C,振荡频率:30 r/min ~ 300 r/min)。
- 6.12 凝胶成像仪。
- 6.13 PCR 反应管。
- 6.14 1.5 mL 带盖离心管。

7 沙门氏菌分离鉴定

7.1 样品采集、储存和运输

7.1.1 组织样品

选择具有典型临床症状的病死鸡,无菌取其肝脏、脾脏等组织样品,放置于无菌容器内,标记好组织名称和采样日期,冷藏运送到实验室进行检测。按照 NY/T 541—2016 中 6.2 执行。

7.1.2 肠内容物样品

按照 NY/T 541—2016 中 6.7.2 执行。

7.1.3 粪便样品

按照 NY/T 541—2016 中 6.8.1 执行。

7.1.4 泄殖腔拭子样品

按照 NY/T 541—2016 中 6.8.2 执行。

7.2 沙门氏菌分离鉴定

按照 GB 4789.4—2016 执行,进行分离、培养,至生化试验部分,完成疑似沙门氏菌菌株的初步鉴定。

8 鸡肠炎沙门氏菌的 PCR 检测方法

8.1 细菌基因组 DNA 提取

将初步鉴定为沙门氏菌的菌株用商品化试剂盒进行基因组 DNA 提取。提取方法按试剂盒说明书要求进行。

8.2 持家基因引物

设计合成七个持家基因的引物。引物 DNA 序列参见 B.1。

8.3 持家基因 PCR 扩增

用 B.1 中所列七对引物对样品基因组 DNA 的七个持家基因分别进行 PCR 扩增。具体实验操作符合 GB/T 28642—2012 检测技术要求。

50 μL PCR 反应体系参见 B.2。

PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.4 PCR 产物电泳

取 5 μL ~ 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(电泳方法参见 GB/T 28642—2012),电泳结束后,用凝胶成像仪观察结果。

8.5 PCR 阳性产物测序

将七个持家基因均扩增出特异性条带的 PCR 产物进行测序。

8.6 结果判定

8.6.1 试验成立条件

利用 B.1 规定的七对引物,阳性对照菌株 PCR 产物电泳后分别出现七条特异性的扩增条带,阴性对照 PCR 产物无扩增条带,试验结果成立。否则试验不成立。七个持家基因的 PCR 产物电泳图参见附录 C。

8.6.2 肠炎沙门氏菌分子分型判定

使用 DNA 序列分析软件,将七个持家基因 PCR 产物 DNA 序列与附录 D 所列参考序列分别进行一一对比(部分基因提供了 2 个~3 个参考序列)。

8.6.3 测序结果判定

七个基因的测序结果与附录 D 中所对应的参考序列(或之一)均完全一致(即:所测 *aroC* 基因序列与 D.1.1 或 D.1.2 中序列之一完全一致、所测 *dnaN* 基因序列与 D.2.1 或 D.2.2 中序列之一完全一致、所测 *hemD* 基因序列与 D.3 中序列完全一致、所测 *hisD* 基因序列与 D.4.1 或 D.4.2 中序列之一完全

一致、所测 *purE* 基因序列与 D.5.1 或 D.5.2 中序列之一完全一致、所测 *sucA* 基因序列与 D.6.1 或 D.6.2 中序列之一完全一致、所测 *thrA* 基因序列与 D.7.1 或 D.7.2 或 D.7.3 中序列之一完全一致), 则可判定样品为肠炎沙门氏菌阳性。



附 录 A
(规范性附录)
培养基配制

A.1 LB 液体培养基**A.1.1 成分**

胰蛋白胨	5 g
酵母提取粉	10 g
氯化钠	10 g
水	1 000 mL

A.1.2 制备

将各成分加入水中,搅混均匀,121 ℃ ± 2 ℃ 高压灭菌 15 min,冷却后备用。

A.2 BPW 前增菌液**A.2.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
水	1 000 mL

A.2.2 制备

将各成分加热溶解于 1 000 mL 水中,121 ℃ ± 2 ℃ 高压灭菌 15 min,冷却后备用。

A.3 SC 增菌液**A.3.1 成分**

蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
磷酸氢二钠	10.0 g
L-胱氨酸	0.01 g
水	1 000 mL

A.3.2 制备

将各成分加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,无菌操作分装于灭菌三角瓶或试管中备用。当天制备当天使用,无需高压灭菌。

A.4 TTB 增菌液

A.4.1 成分

蛋白胨	9.0 g
牛肉粉	4.5 g
氯化钠	2.7 g
碳酸钙	40.5 g
胆盐	5.0 g
硫代硫酸钠	50.0 g
水	1 050 mL

A.4.2 制备

将各成分溶解于 1 050 mL 蒸馏水中,加热煮沸,临用前加入 20% 碘液 20 mL,0.1% 煌绿 10 mL,现配现用。

A.5 XLD 鉴别培养基

A.5.1 成分

酵母浸粉	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
硫代硫酸钠	6.8 g
氯化钠	5.0 g
苯酚红	0.08 g
琼脂	13.0 g
水	1 000 mL
pH 7.4±0.2	25 °C

A.5.2 制备

将上述成分加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,冷至 50 °C 左右时,倾入无菌平皿,备用。

A.6 TAE 电泳缓冲液

A.6.1 50×TAE 电泳缓冲液成分

Tris-乙酸	40 mmol/L
EDTA(pH 8.0)	1 mmol/L

A.6.2 1×TAE 电泳缓冲液制备

先按 A.6.1 所示成分配制 50×TAE 电泳缓冲液,将其用蒸馏水 50 倍稀释即为工作浓度。

附 录 B
(资料性附录)
测序引物与反应体系

B.1 七个持家基因测序引物见表 B.1。

表 B.1 七个持家基因片段 PCR 引物序列

基因名称	引物序列	片段大小
<i>thrA</i>	F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	852 bp
<i>aroC</i>	F 5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3' R 5'-CCACACACGGATCGTGCG-3'	826 bp
<i>dnaN</i>	F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' R 5'-AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC-3'	833 bp
<i>sucA</i>	F 5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3' R 5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'	643 bp
<i>hisD</i>	F 5'-TCGCGTCTGTCGGTCTGTAT-3' R 5'-GGCGCAGTATAGCCATAGGT-3'	755 bp
<i>hemD</i>	F 5'-ATGAGTATTCTGATCACCCG-3' R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	666 bp
<i>purE</i>	F 5'-GACACCTCAAAAGCAGCG-3' R 5'-CGAGAACGCAAACCTTGCTTC-3'	510 bp

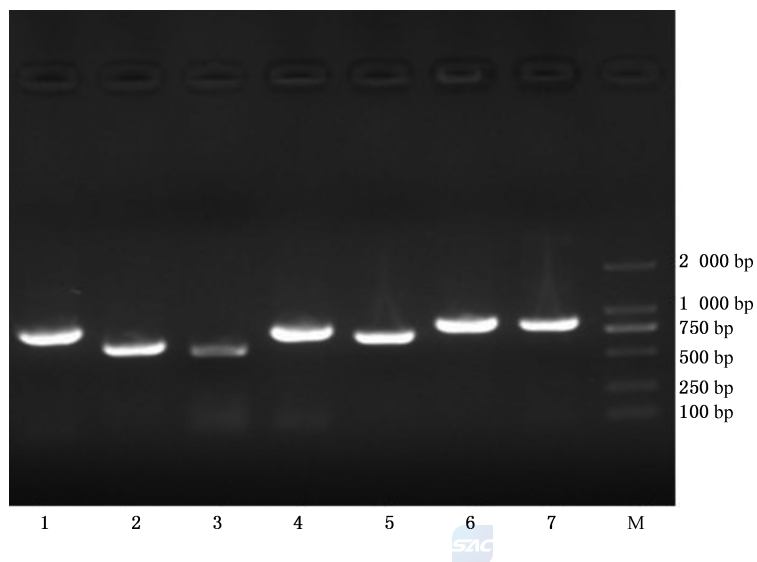
B.2 PCR 反应体系见表 B.2。

表 B.2 PCR 扩增反应体系

组分	体积/ μL
ddH ₂ O	19.0
2× PCR Mix	25.0
F 上游引物	2.0
R 下游引物	2.0
DNA 模板	2.0
总体积	50.0

附录 C
(资料性附录)
七个持家基因 PCR 电泳图

肠炎沙门氏菌阳性菌株七个持家基因 PCR 电泳图见图 C.1。



说明:

1——*thrA*;

2——*sucA*;

3——*purE*;

4——*hemD*;

5——*hisD*;

6——*dnaN*;

7——*aroC*;

M——DNA Marker Trans 2K。

图 C.1 阳性对照菌的七个持家基因 PCR 扩增结果电泳图

附 录 D
(资料性附录)
七个持家基因 DNA 序列

D.1 *aroC* 基因

D.1.1 *aroC* 5/*aroC* 454

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAAA
TACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGG(C/T)TGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCC
GCTGGAGATTAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAAAC
TTGACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAGT
GACGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCG
GACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTA
ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

D.1.2 *aroC* 41

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAAA
TACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCGCT
GGAGATTAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCCGATGCGGACAACTTG
ACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAGTGAC
GGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGTATTTGACCGACTGGATGCGGAC
ATCGCCCATGCGCTGATGAGCATTAAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAACG
TGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

D.2 *dnaN* 基因

D.2.1 *dnaN* 2/*dnaN* 494

ATGGAGATGGTCGCGCGGTTACGCTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGGC
GCGGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGAAG
GCGATCGGATGCTGGTGCGTTCTGGCCGTAGCCGTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCCGATT

TCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAAGCG
 CCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTATGC
 TGTTTGAAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGC(C/T)TGGCGGTG
 TGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGAT
 TGAAGTATGCGTATGCTCGACGGCGGTGAAAACCCGCTGCGCGTGCAG

D.2.2 *dnaN* 67

ATGGAGATGGTCGCGCGGTTACGCTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGCGCCACTACTGTGCCGGC
 GCGGAAATTCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAGTTGGAAG
 GCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCCGATT
 TTCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAAGCG
 CCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTATGC
 TGTTTGAAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGTGTG
 CTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGATTG
 AACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCAG

D.3 *hemD* 基因

GCGACACTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGGCCCTTTCACAGCACGCCGTCGCCTTTGCTCACGC
 CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACCA
 CGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAGC
 GAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTGGCTGG
 CAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTGT
 GAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
 GCGGCGTAACAACGCTTGTTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

D.4 *hisD* 基因

D.4.1 *hisD* 7/966

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
 GCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
 GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
 CGAAGCCAAACGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCCG

TCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTCGTCGCTTCTGACCTGCTCTC
CCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTCGCAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCTGCA
AGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCAGA AACTGCCGCGCGCGGACAC(C/T)GCCAGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

D.4.2 *hisD* 14

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACA AACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGGCGGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAACGTCAGGTCAAGCCAGCGTCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCCG
TCTGAAGTACTGGTGATCGCAGACAGCGGCGCAACACCGGATTCGTCGCTTCTGACCTGCTCTC
CCAGGCTGAGCACGGCCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCGCA
AGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCAGG
CCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC



D.5 *purE* 基因

D.5.1 *purE* 5

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTCCGCTCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGCGCGGGCGGGCGCGGCACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATAG
CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAAGCCG
GTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATCA
GCGCATTGCCGAC

D.5.2 *purE* 6

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGCGCGGGCGGGCGCGGCACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATAG
CCTCTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAAGCCG
GTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATCA
GCGCATTGCCGAC

D.6 *sucA* 基因**D.6.1 *sucA* 6**

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATTCCC
 GGGTGCGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTT
 CGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGCTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCCTGA
 ACGTGCTGATCAACGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTCGACGAATTTGCCGGTAAGCAT
 AAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCG
 AAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCTGGCGTTTAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGTG
 GTGATGGGCTCCGTGCGCGCCCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTTCG
 CGATCACTATTCACGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

D.6.2 *sucA* 192

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATTCCC
 GGGTGCGAAACGTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTT
 CGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGCTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCCTGA
 ACGTGCTGATCAACGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTCGACGAATTTGCCGGTAAGCAT
 AAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCG
 AAGGCGGTCTGGTTACCTGGCGCTGGCGTTTAACCCATCGCACCTGGAAATTGTGAGCCCGGTG
 GTGATGGGCTCCGTGCGTGCCCGTCTGGACCGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTTCG
 CGATCACTATTCACGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

D.7 *thrA* 基因**D.7.1 *thrA* 1**

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACTG
 CTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCA
 GACTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCCTT
 CACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTAA
 TCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGGG
 ATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTGG
 GATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCAGT
 CCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGAGAGTGACTGC

D.7.2 *thrA 10*

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACTG
CTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCA
GGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGA ACTCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTCTT
CACCCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAAAAATACCGGTAA
TCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGGG
ATCTCTAACCTTAACAATATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCCGGAATGAAAGGGATGATTGG
GATGGCGGCGCGTGTTTTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCAGT
CCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

D.7.3 *thrA 11*

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACTG
CTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGCCA
GGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGA ACTCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTCTT
CACCCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAAAAATACCGGTAA
TCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAACCTGCCGGTTAAAGGG
ATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCCGGAATGAAAGGGATGATTGG
GATGGCGGCGCGTGTTTTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCAGT
CCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

