



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

ESTABLISHMENT OF MICROBIAL DATABASE FOR A SUSTAINABLE
ENVIRONMENT

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์

ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550-2551

จำนวน 398,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางปิยะนุช เนียมทรัพย์

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวสมคิด ดีจริง

นางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 มีนาคม 2552

การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อม

ESTABLISHMENT OF MICROBIAL DATABASE FOR A SUSTAINABLE ENVIRONMENT

ปิยะนุช เนียมทรัพย์¹ สมคิด ดีจิง¹ เรือนแก้ว ประพฤติ²

PIYANUCH NIAMSUP¹, SOMKID DEEJING¹, REUNKAEW PRAPLEUT²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานทางสิ่งแวดล้อม เพื่อให้มีการเก็บข้อมูลของจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างเป็นระบบและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งสามารถเผยแพร่ต่อบุคคลทั่วไปให้เข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการเชื่อมต่อฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไว้ทางระบบเครือข่ายทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ทางสิ่งแวดล้อม คือ สามารถย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย รวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน รวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ 3 รูปแบบด้วยกัน คือ การเก็บบนอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธี 16S rDNA sequencing รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลท พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายขยะและน้ำเสียส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคล้ายราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*

ABSTRACT

In this research, we have established microbial database for sustainable environment, to preserve microbiological materials and information which can be offered to the scientific community both inside and outside Maejo University. We have preserved microbial isolates which have high ability to utilize compounds in environment, 120 isolates utilized compounds in waste and 110 isolates utilized compounds in oil. All of the isolates were deposited in three ways which consisted of keep on agar slant, keep in glycerol at -80°C and freeze-drying.

Total of 92 microbial isolates which capable to utilized compounds in sewage, wastewater and oil were identified by 16S rDNA sequencing. Most of isolates with sewage and wastewater degrading ability were identified to the genus *Bacillus* such as *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*. Some of them were identified as actinomycetes in genus *Streptomyces*. Most of the isolates with oil degrading ability were identified to genus *Acinetobacter* and *Bacillus*.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2550-2551

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

นางปิยะนุช เนียมทรัพย์

นางสาวสมคิด ดีจริง

นางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
ABSTRACT	(ข)
กิตติกรรมประกาศ	(ค)
สารบัญ	(ง)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
การตรวจเอกสาร	4
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	8
อุปกรณ์การวิจัย	8
วิธีการวิจัย	9
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	13
สรุปผลการวิจัย	20
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก ก	22
ภาคผนวก ข	34

คำนำ

ทุกวันนี้ปัญหาขยะและน้ำเสีย รวมไปถึงการปนเปื้อนน้ำมันในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาระดับชาติของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมืองใหญ่ที่มีประชากรมากและมีโรงงานอุตสาหกรรมตั้งอยู่ด้วย เช่น กรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ เป็นต้น ขยะนั้นมีการประกอบหลากหลายรวมกันอยู่ และแต่ละประเภทนั้นมีอายุการสลายตัวที่แตกต่างกัน บางชนิดสลายตัวได้ช้ามาก การแยกขยะจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้การบำบัดทำได้ดี ขยะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ก็คือ ขยะที่มีการประกอบพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง โปรตีนและไขมัน ซึ่งหากนำมาย่อยสลายแล้วสามารถทำเป็นปุ๋ยได้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายประกอบเหล่านี้ได้ โดยการสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ หรือสร้างแล้วยังอยู่ในเซลล์ ซึ่งมักตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้จากดินและจากแหล่งต่างๆ ที่มีการประกอบดังกล่าวสะสมอยู่ แต่ที่เป็นปัญหาในทุกวันนี้ เนื่องจากปริมาณขยะมีมากและประชากรมักทิ้งกองหรือทิ้งลงในแม่น้ำลำคลอง มีจำนวนมากจนธรรมชาติฟอกตัวเองไม่ทัน ส่วนน้ำเสียนั้นก็มีปัญหาเช่นกัน เมื่อมีชุมชนใหญ่ก็就会有การปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะโดยไม่มีการบำบัดก่อน จึงทำให้แหล่งน้ำสาธารณะฟอกตัวเองไม่ทัน ประกอบกับโรงงานอุตสาหกรรมบางแห่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรงงานที่เป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนซึ่งไม่มีพื้นที่หรือระบบการจัดการที่ดีพอก็ระบายน้ำเสียสู่ท่อ ระบายน้ำลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะซึ่งก่อให้เกิดน้ำเสียเช่นกัน นอกจากการออกกฎหมายควบคุมการทิ้งขยะและการระบายน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมแล้ว การรณรงค์ให้ประชาชนทั่วไปร่วมมือกันแยกขยะ และหาวิธีการนำมาใช้ใหม่เพื่อลดจำนวนขยะเป็นสิ่งจำเป็นแล้ว การกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียโดยใช้จุลินทรีย์ เพื่อลดระยะเวลาการสลายตัวของขยะและน้ำเสียทุกชนิดก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ ส่วนสาเหตุหลักของการเกิดปัญหาน้ำมันปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมคือ การเกิดอุบัติเหตุทางการขนส่งน้ำมันทางทะเล ซึ่งปัญหาจะพบในบริเวณเฉพาะ คือ ในทะเล มหาสมุทรและแม่น้ำที่มีเรือขนส่งและขนถ่ายน้ำมัน รวมทั้งการรั่วไหลของน้ำมันจากเรือประเภทต่าง ๆ แต่ในปัจจุบันจากความต้องการใช้น้ำมันของประเทศที่นับวันมีความต้องการที่สูงขึ้น ทั้งในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนน้ำมันที่เหลือใช้จากกิจกรรมต่าง ๆ ทั้งในดินและในน้ำ สาเหตุใหญ่ในการปนเปื้อนของน้ำมันในสิ่งแวดล้อมจึงพบว่าเกิดมาจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น น้ำมันที่เกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ ของอุตสาหกรรม การรั่วไหล ของถังเก็บน้ำมันของปั้มน้ำมัน น้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหาร เป็นต้น ซึ่งปัญหาเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและส่งผลกระทบต่อเนื่องมาอยู่ของมนุษย์

ในต่างประเทศมีผู้สนใจนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาเติมในขยะและน้ำเสียนอกเหนือ ไปจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติแล้ว เพื่อลดปริมาณของสารพิษและเพื่อให้การสลายตัวของสารอินทรีย์เป็นไปด้วยความรวดเร็วยิ่งขึ้น ในระยะนี้มีการนำเข้าจุลินทรีย์จากต่าง

ประเทศมาใช้ในการกำจัดขยะและน้ำเสียหลายชนิด แต่ก็อยู่ในขั้นทดลองและโฆษณา การนำจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในประเทศอาจไม่ได้ผลเท่าที่ควรและมีราคาแพง การที่จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายและต้องการสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และจากการที่พบว่าที่ใดมีสารประกอบอยู่ ที่นั้นย่อมต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบนั้นอยู่ด้วยเสมอ การคัดเลือกจุลินทรีย์จากท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียแต่ละชนิดในท้องถิ่นจึงน่าจะให้ผลที่ดีกว่า และถ้าขยะและน้ำเสียนั้น มีความซับซ้อนของสารมากก็อาจนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาศึกษาการอยู่ร่วมกันเพื่อทำให้การกำจัดขยะหรือบำบัดน้ำเสียเกิดประสิทธิผลมากที่สุด และจัดทำให้จุลินทรีย์อยู่ในรูปแบบที่ให้แต่ละครัวเรือนหรือหน่วยงานสามารถนำไปใช้งานได้สะดวกที่สุด ส่วนการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันที่เกิดขึ้น โดยใช้จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ซึ่งเป็นวิธีการที่นักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาและพัฒนามากที่สุด ทั้งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ และจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมที่พบว่ามีความสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดี แต่สำหรับประเทศไทยการใช้สิ่งมีชีวิตปรับปรุงพันธุ์ยังเป็นข้อจำกัดในการใช้งานอยู่มาก ดังนั้นการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันจากธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องและเป็นระบบอย่างแท้จริง พร้อมทั้งการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหล่านี้

อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยการวิจัยเพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยเน้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเด่นในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขยะ น้ำเสียและย่อยน้ำมัน ทั้งในรูปแบบของการศึกษา ค้นคว้าและเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทนี้อย่างเป็นระบบนั้นพบว่ามีน้อย ในโครงการนี้จึงมีการเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างมีระบบของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแยกและคัดเลือกได้ รวมทั้งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง รวมถึงการทำธนาคารพันธุ์ (Gene bank) ของเชื้อที่ได้และจัดทำเป็นฐานข้อมูล เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์ วัสดุพันธุกรรม ที่แยกและคัดเลือกได้
2. เพื่อรวบรวมและจัดการด้านข้อมูลจุลินทรีย์ให้เป็นระบบสากล
3. เพื่อเป็นศูนย์กลางความร่วมมือระหว่างหน่วยงานต่าง ๆ ด้านการจัดการข้อมูลและวิจัยร่วม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายขยะ น้ำเสีย และน้ำมันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมในรูปแบบที่แตกต่างกัน
2. เป็นแหล่งอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศ
3. ได้สนับสนุนการสร้างระบบการเก็บรักษาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เพื่อสิ่งแวดล้อมอย่างเป็นรูปธรรม



การตรวจเอกสาร

1. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (สมบูรณ์, 2539)

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นแตกต่างกันตั้งแต่ง่าย ๆ จนถึงกรรมวิธีที่ยุ่งยากต้องใช้เครื่องมือราคาแพง รวมทั้งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงาน ประสิทธิภาพของวิธีการเก็บเชื้อก็แตกต่างกันไป ดังนั้นการที่จะเลือกใช้วิธีใดในการเก็บรักษาเชื่อนั้นควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมสอดคล้องกับจุดประสงค์ในการใช้เชื้อจุลินทรีย์

ปัจจัยที่นำมาใช้พิจารณาในการเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อ

1.1 คงสภาพการมีชีวิต (maintenance of viability)

วิธีการต่าง ๆ มีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะตายไปในระหว่างกระบวนการเก็บเชื้อ (preservation process) และในช่วงการเก็บ (storage) ดังนั้นควรเลือกใช้วิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ตายในระหว่างกระบวนการน้อยที่สุด และตายในช่วงการเก็บน้อยที่สุดด้วย รวมทั้งสามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้ยาวนาน

1.2 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากร (population change through selection)

ควรเลือกวิธีที่ทำให้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable cell) เหลืออยู่จำนวนมากใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในตอนเริ่มต้น เพื่อขจัดปัญหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (characteristics) บางอย่างของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการ เพื่อกคงความอยู่รอดของจุลินทรีย์

1.3 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic change)

วิธีการเก็บรักษาเชื้อไม่ควรทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutation) หรือการสูญหายของ plasmids ไปจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียสูญหายไปหรือมีลักษณะใหม่เกิดขึ้นมาส่งผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตสารต่าง ๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ รวมทั้งการศึกษาทางสรีรวิทยาของเชื้อด้วย

1.4 ความบริสุทธิ์ (purity)

ต้องเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อไว้ให้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์ (pure) ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ จากภายนอก

1.5 ค่าใช้จ่าย (expense)

ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งในด้านแรงงาน เครื่องมือ วัสดุ สถานที่เก็บรักษาเชื้อ พลังงานที่ใช้ในกระบวนการเก็บเชื้อและเวลาที่เชื้อเก็บไว้ได้นานแค่ไหน ตัวอย่างเช่น การเก็บเชื้อด้วยวิธี freeze-

drying ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง แต่เป็นวิธีที่ประหยัดแรงงาน สามารถเก็บเชื้อไว้ได้นาน ๆ โดยไม่ต้องเสียเวลาทำการเลี้ยงเชื้อใหม่

1.6 จำนวนเชื้อที่ต้องเก็บรักษา (number of cultures)

ควรเลือกวิธีการที่เหมาะสมกับจำนวนสายพันธุ์ที่ต้องการเก็บรักษา และพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บ (storage) เช่น บางวิธีเหมาะสมในเก็บรักษาสายพันธุ์ที่มีจำนวนน้อย แต่หากต้องการเก็บเชื้อหลากหลายสายพันธุ์มากขึ้นก็จะสิ้นเปลืองแรงงานและต้องใช้พื้นที่ในการเก็บ (storage) มากขึ้น เป็นต้น

1.7 ความสำคัญของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา (value of cultures)

ความสำคัญของสายพันธุ์เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงเป็นอย่างยิ่ง ในการเลือกวิธีการเก็บรักษา สายพันธุ์ที่มีความสำคัญมาก ๆ จะต้องเลือกใช้วิธีการที่สามารถรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดและคงลักษณะต่าง ๆ ไว้ได้ แต่หากเป็นสายพันธุ์ธรรมดาทั่วไป ที่ไม่สำคัญนั้นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงก็คือ ค่าใช้จ่ายและแรงงานที่ต้องใช้ในการเก็บรักษา

1.8 การขนส่งเชื้อไปยังผู้ใช้ (supply and transportation of cultures)

ในกรณีที่ต้องส่งเชื้อจุลินทรีย์ไปยังสถานที่ต่าง ๆ นั้น จำเป็นต้องเก็บแต่ละสายพันธุ์ไว้หลาย ๆ ช้ำเป็นจำนวนมาก ต้องมีพื้นที่ในการเก็บไว้ (storage) ก่อนแจกจ่าย จึงต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสม เพื่อสะดวกในการเก็บรักษาในการขนส่งทางไปรษณีย์ ซึ่งอาจต้องใช้เวลาหลายวัน และจะต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของไปรษณีย์ในการส่งเชื้อเข้าประเทศหรือท้องถิ่นแต่ละแห่ง

1.9 ความถี่ในการนำเชื้อมาใช้ประโยชน์ (frequency of use of cultures)

จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ใช้ใน bioassay หรืออุตสาหกรรมการผลิตสารต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้บ่อย ๆ นั้นควรเลือกวิธีการเก็บรักษาที่ไม่ทำให้ stock culture เกิดการปนเปื้อนและนำมาใช้ได้เลยไม่มีวิธีการเก็บรักษาเชื้อวิธีใดที่บรรลุจุดประสงค์ทั้ง 9 ข้อได้ ดังนั้นการเลือกใช้จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของผลประโยชน์ที่จะได้รับรวมทั้งผลเสียจากวิธีนั้นด้วย

2. วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ (Kirsop และคณะ, 1984; Robert และคณะ, 1995)

2.1 Subculture

เป็นการย้ายเชื้อจุลินทรีย์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งบรรจุในหลอด หรือขวด หลอดหนึ่งให้เป็น seed stock อีกหลอดให้เป็น working culture นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงนำไปเก็บไว้ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ หรืออาจเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C

แต่ต้องทำการย้ายเชื้อเสมอ ๆ เพื่อป้องกันเชื้อตายไปหมด ความถี่ห่างในการย้ายเชื้อมากน้อยแค่ไหน ขึ้นกับชนิดของเชื้อ โดยทั่วไปต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 3 เดือน

2.2 Drying

เป็นวิธีการเก็บจุลินทรีย์ไว้บนตัวกลางที่แห้ง และป้องกันการดูดซับน้ำเข้าไปอีกในระหว่างการเก็บ เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อรา ยีสต์ ซึ่งทนทานต่อความแห้งหรือมีค่า aw ต่ำกว่าแบคทีเรีย แต่ก็มีแบคทีเรียหลายสกุล สามารถเก็บรักษาได้โดยวิธี drying ซึ่งใช้ตัวกลางแตกต่างกัน

1. เก็บบนทรายหรือดินหรือ kieselguhr หรือซิลิกาเจล โดยการหยด suspension ของเชื้อ คลุกเคล้ากับตัวกลางที่ปลอดเชื้อซึ่งบรรจุในขวดที่ป้องกันความชื้นได้ แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดและคงสภาพเดิมไว้ได้หลายปี

2. เก็บบนแถบกระดาษหรือแผ่นกระดาษ (paper strips or paper discs) โดยหยด suspension ของเชื้อบนแถบกระดาษกรองหรือแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อนำไปทำให้แห้ง แล้วเก็บไว้ในซองพลาสติก หรือ aluminium foil ที่ปลอดเชื้อและปิดสนิท

3. เก็บบน predried plug โดยบรรจุวัสดุเช่น peptone, แป้งหรือ dextran ในหลอดเล็ก ๆ แล้วหยด suspension ของเชื้อลงไป จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้งและดูดอากาศออก เพื่อให้เชื้ออยู่ในสุญญากาศ เหมาะสำหรับเชื้อที่เปราะบางไม่ทนทานต่อกระบวนการเก็บแบบ freeze-drying

4. เก็บบนแผ่นเจลาติน (gelatin discs) นำเชื้อจุลินทรีย์มาผสมกับ gelatin medium ซึ่งมีส่วนผสมอื่น ๆ อีกขึ้นกับสปีชีส์ จากนั้นจึงหยดบนจานปลอดเชื้อแล้วทำให้แห้งหรือนำไปทำ freeze-dried เก็บหยดเจลาตินนี้ในขวดที่มี silica gel เพื่อดูดซับความชื้น วิธีการนี้เก็บแบคทีเรียไว้ได้นานหลาย ๆ ปี

2.3 Freeze-drying

เป็นกระบวนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างแช่แข็ง (frozen sample) โดยการระเหิดโดยการผสมแบคทีเรียลงในอาหารที่เหมาะสม แล้วนำไปทำให้เย็นจัดจนเป็นน้ำแข็ง จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากตัวอย่างในสุญญากาศ น้ำที่ระเหิดออกมาจะถูกดูดซับด้วย phosphorous pentoxide หรือถูกเก็บไว้ที่ condenser ของเครื่องทำความเย็น ตัวอย่างที่ทำให้แห้งแล้วจะถูกทำให้อยู่ในสภาพสุญญากาศหรือมี inert gas แล้วใส่ไฟเชื่อมหลอดแก้ว (vials หรือ ampoules) ให้ปิดสนิท

ในการทำ freeze-drying นั้นควรมีการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ เช่น ควรนำแบคทีเรียมาจาก growth phase ช่วงใด อุณหภูมิใดที่ควรใช้ในการบ่มเชื้อก่อนนำมาเก็บรักษา ส่วนประกอบของ suspending medium ที่เหมาะสม อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะในขณะทำ freezing ความชื้นควรคงเหลืออยู่เท่าใด เหล่านี้เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดและคงคุณสมบัติไว้ได้ยาวนานของเชื้อ

2.4 Freezing

เป็นวิธีการที่ลดค่า aw หรือ available water โดยการให้น้ำกลายเป็นน้ำแข็ง จากนั้นจึงนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกดองน้ำออกนี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเช่นที่ -20°C , -30°C , -40°C , -70°C , -140°C , -196°C แต่ที่ -70°C นิยมใช้กับจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย มัยโคพลาสมา โปรโตซัว ไวรัส มีวิธีการเก็บดังนี้

2.4.1 เก็บบนเม็ด glass bead ที่ -70°C

โดยการผสมแบคทีเรียใน glycerol suspending medium แล้วนำไปคลุกเคล้ากับ glass bead จากนั้นจึงเก็บไว้ที่ -70°C เป็นวิธีการที่ง่ายแต่ก็มีข้อเสียคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และสิ้นเปลืองพลังงานในการผลิตความเย็นที่ -70°C หรือในกรณีที่กระแสไฟขัดข้องทำให้สูญเสียสภาพ -70°C ก็จะมีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ ในกรณีที่ต้องใช้เชื้อในการศึกษาบ่อย ๆ นั้น ไม่สามารถนำเชื้อมาใช้ได้เลยต้องนำมา subculture ก่อน นอกจากนี้ยังไม่สามารถแจกจ่ายหรือบริการเชื้อทางไปรษณีย์ได้

2.4.2 เก็บในไนโตรเจนเหลว

ที่อุณหภูมิ -196°C เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเก็บรักษา แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่าย ไวรัส ยีสต์ bacteriophage, mammalian cell, tissue culture โดยการผสมสิ่งเหล่านี้ใน cryoprotectants ที่เหมาะสมซึ่งบรรจุในหลอดแก้วเล็ก ๆ จากนั้นจึงนำลงไปแช่ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

3. การหาลำดับเบสดีเอ็นเอของจุลินทรีย์

เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของเส้นดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ โดยผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการหลายๆ แห่งสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ หรือจาก nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA), ENBL (European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Database of Japan) (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับดีเอ็นเอโดยตรง นำที่จะให้ผลการตรวจสอบที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

เวลา	เริ่มดำเนินการ	เดือน ตุลาคม 2549
	เสร็จสิ้น	เดือน มีนาคม 2552

สถานที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อุปกรณ์การทำวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา รวมทั้งโต๊ะปฏิบัติการและเก้าอี้ปฏิบัติการ
2. ตู้เยื่อเชื้อ (Laminar flow)
3. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบดิจิทัล
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
5. ตู้บ่ม -80 องศาเซลเซียส
6. ตู้อบความร้อนสูง (Hot air oven)
7. ตู้แช่เย็นแบบ
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
9. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
10. ปิเปตอัตโนมัติ
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
12. ชุดตะเกียงเบนเซน
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)
14. เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)
15. เครื่องแก้ว หลอดทดลอง
16. สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และชุดวิเคราะห์ต่างๆ

วิธีการวิจัย

1. การออกแบบระบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์

โดยใช้โปรแกรม Microsoft Access เพื่อให้สามารถจัดเก็บจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการเรียกข้อมูล โดยการออกแบบให้มีการเก็บบันทึกข้อมูลที่สำคัญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้นด้วย

2. การจัดเก็บรักษาสายพันธุ์

เก็บรักษาสายพันธุ์อย่างน้อย 2 วิธีต่อสายพันธุ์ โดยมีวิธีการเก็บดังนี้

2.1 การเก็บรักษาแบบ subculture

เป็นวิธีที่ใช้สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งหรือแห้งแข็งได้ ทำโดยการพิมพ์เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด วันเดือนปีที่เก็บเชื้อ ลงบนกระดาษสำหรับติดเชื้อเป็นจำนวน 2 ชุด แล้วนำกระดาษแต่ละแผ่นไปติดบนหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลอด ปิดทับด้วยเทปใสลงบนแผ่นกระดาษอีกครั้ง โดยเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะเชื้อมาขีดซิกแซกไปมาบนผิวหน้าวุ้นซึ่งเป็น agar slant เป็นจำนวน 2 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิและสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C

2.2 การเก็บเชื้อแช่แข็งบน glass bead

ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มล. ใส่ใน glycerol suspending medium 4 มล. เขย่าบน vortex mixer เพื่อให้เชื้อกระจายใน glycerol suspending medium หลังจากนั้นปิเปตเชื้อที่แขวนลอยใน glycerol suspending medium ใส่ในหลอดบรรจุ glass bead หมุนหลอดไปมาเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียเคลือบไปบน bead จนทั่ว แล้วจึงใช้ฟาสเจอร์ปิเปตดูดเอา suspension ของเชื้อที่เหลือที่ก้นขวดออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดน้ำแข็งที่ทำให้ glass bead เกาะติดกัน ติดฉลากชื่อเชื้อบนหลอดเก็บเชื้อ ปิดทับด้วยเทปใสอีกครั้ง นำไปเก็บในกล่องพลาสติกแล้วจึงเก็บใน deep freezer ที่อุณหภูมิ -60°C ถึง -75°C

2.3 การเก็บรักษาเชื้อโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying)

ใช้ฟาสเจอร์ปิเปตปลอดเชื้อ ดูด suspending medium ปริมาณ 1-2 มล. ใส่ในหลอด agar slant แล้ว จึงใช้ปลายฟาสเจอร์ปิเปตขีดเชื้อเบา ๆ ที่ผิววุ้น ทำให้เชื้อกระจายใน suspending medium อย่างสม่ำเสมอ อย่าให้เกิดฟองอากาศ ใช้นิ้วมืองัดจุลลาล์ที่ปิดหลอดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

และใช้พาสเจอร์บีเปิดดูด suspension ของแต่ละเชื้อในปริมาตรหลอดละ 0.2 มล. ใส่ลงไปในแต่ละหลอดที่พิมพ์รหัสเชื้อไว้แล้ว ระวังอย่าให้ปลายพาสเจอร์บีเปิดสัมผัสกับคอขวดของหลอด จากนั้นจึงเผาปากหลอดอีกครั้งแล้วจึงดูดด้วยจุกสำลี นำหลอด ampule ที่ใส่เชื้อแล้วไปแช่ใน 95% ethyl alcohol ที่บรรจุในบีกเกอร์แล้วนำไปแช่ใน freezer อุณหภูมิ -70°C เมื่อเชื้อในหลอดเป็นน้ำแข็ง จึงนำบีกเกอร์ใส่ในกระติกน้ำแข็ง เพื่อเคลื่อนย้ายไปที่เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

2.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -196°C ในถังไนโตรเจนเหลวหรือ -150°C ในตู้แช่เยือกแข็ง วิธีนี้ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ถาวร โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ หรือเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์แบบกึ่งถาวรโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่อยู่ระหว่างการศึกษาดูทดลองภายในหน่วยงาน

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกในการย่อยสลายโปรตีน แป้ง ไขมัน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในอาหารเหลวนิวเทรียนต์ (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยบีบเปิดเชื้อแบคทีเรียมา 1.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็กขนาด 1.9 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปบั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนใสด้านบนทิ้งจนหมด ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA) โดยเติมสารละลาย Micro Bead 300 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ถ่ายเซลล์แขวนลอยลงใน Micro Bead tube เติมสารละลาย MD1 50 ไมโครลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าแนวนอนที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 10 นาที บั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที บีบเปิดส่วนใสใสในหลอดใหม่ จะได้ของเหลวประมาณ 300 ไมโครลิตร เติมสารละลาย MD2 100 ไมโครลิตร ผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปบั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสด้านบนออกมาใส่หลอดใหม่ 450 ไมโครลิตร เติมสารละลาย MD3 900 ไมโครลิตร ผสมเป็นเวลา 5 วินาที บีบเปิดส่วนใส 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กที่มีตัวกรอง (spin filter) บั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง บีบเปิดส่วนใสที่เหลือมาอีก 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กที่มีตัวกรอง (spin filter) หลอดเดิม นำไปบั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เท

สารละลายด้านบนทิ้ง เดิมสารละลาย MD4 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายตัวกรอง (spin filter) ลงในหลอดขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ เดิมสารละลาย MD5 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งตัวกรอง จะได้ดีเอ็นเออยู่ในหลอดที่บรรจุสารละลาย MD5 จากนั้นวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และทำให้บริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ดัดแปลงจากวิธีการของ Yeung *et al.* (2002), Sow *et al.* (2005) และ Flint และ Angert (2005) โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCKCCTCCC-3') (Operon, Germany) ซึ่งตรงกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง V1-V3 ประมาณ (500 bp) ของยีนส่วน 16S rRNA ทำการเตรียมปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบด้วย mastermix (Eppendorf, USA) 20 ไมโครลิตร (Mg 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์, Taq PMA polymerase 1.25 U) 27F 2 ไมโครลิตร (20 พิโกโมลาร์) 520R 2 ไมโครลิตร (20 พิโกโมลาร์) ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ PCR Sprint Thermal Cycler (ยี่ห้อ Thermohybrid รุ่น Sprint) โดยตั้งโปรแกรมในการทำงานดังนี้

25 รอบ	Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Annealing	55 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Terminating	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

หลังจากนั้นทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดยใช้ TaKaRa SUPREC™-PCR, Japan ดังนี้ ปิเปต PCR product 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (pH 8.0) 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ห้องเหลวที่ตกลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) หลอดใหม่ เติม TE buffer (pH 8.0) 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและชุดดีเอ็นเอที่ค้างอยู่บนฟิวเตอร์ในคอลัมน์ให้หลุดออกมา คว่ำคอลัมน์ลงในหลอดขนาดเล็ก (eppendorf) หลอดใหม่ นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ PCR product ที่บริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตร นำไป run gel 5 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบขนาด ความเข้มข้นของ PCR product และสิ่งปนเปื้อน เริ่มจากเตรียมเจลด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล จากนั้นวางเจลที่มีหลุมที่ปลายด้านหนึ่งลงในเครื่อง run gel เท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล ใช้ loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES) 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดลงในหลุมบนเจลและใช้ marker ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas LIFE SCIENCES) จำนวน 5 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ส่องดูแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับ GenBank database โดยใช้ BLAST จะทราบจีโนมและสปีชีส์

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การออกแบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์

ได้ทำการค้นคว้ารวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ (microbial database) จากสถาบันเก็บจุลินทรีย์ทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ได้มาตรฐาน เช่น ศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หรือ TISTR Microbiological Resources Center (<http://www.tistr.or.th/mircen>), American Type Culture Collection หรือ ATCC (<http://www.atcc.org>), Japan Collection of Microorganisms หรือ JCM (<http://www.jcm.riken.go.jp>) โดยได้ปรึกษาร่วมกับผู้ออกแบบและจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อทำการออกแบบฐานข้อมูลให้ได้ตามที่ต้องการ และได้มาตรฐานเทียบเท่าระดับสากล และได้ทำการทดสอบจุดบกพร่องของฐานข้อมูล เพื่อรองรับการใช้งานร่วมกับระบบเครือข่ายในอนาคต

โดยข้อมูลที่สามารถบรรจุลงในฐานข้อมูลนั้นเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญ ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อนำประยุกต์ใช้ได้ง่าย โดยฐานข้อมูลถูกออกแบบเพื่อให้สามารถใช้คำสำคัญในการค้นหาข้อมูลในระบบได้ ข้อมูลที่สำคัญที่สามารถบรรจุลงในฐานข้อมูลมีทั้งชื่อทางวิทยาศาสตร์และชนิดของจุลินทรีย์ ระดับความปลอดภัย (biosafety level) สภาพะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสม การนำไปประยุกต์ใช้ และลำดับเบสของดีเอ็นเอ

โดยทางผู้ออกแบบระบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ได้ทำการเขียนคู่มือการใช้งานฐานข้อมูลจุลินทรีย์ เพื่อถ่ายทอดผู้ใช้งานและดูแลฐานข้อมูล โดยได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

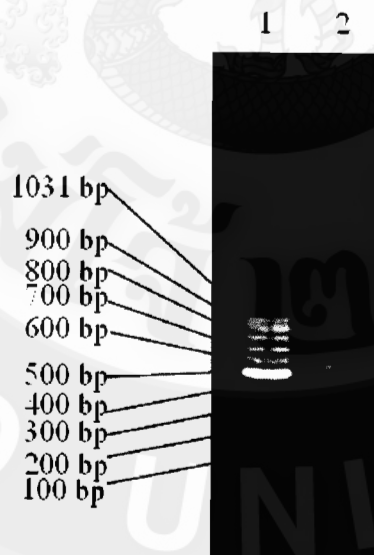
2. การจัดเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์

ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย (โครงการย่อยที่ 1) ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน ที่ได้จากโครงการการแยกและคัดเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมัน (โครงการย่อยที่ 2) ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ถูกจัดเก็บไว้ใน 3 รูปแบบด้วยกันคือ การเก็บรักษานานอาหารผิวหน้าวุ้นเยือก การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) เพื่อรอการนำไปจำแนกด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในลำดับต่อไป

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการจัดการสิ่งแวดล้อม

จากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่รวบรวมได้ทั้งสิ้น 330 ไอโซเลท ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลท โดยนำมาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป จากนั้นนำ genomic DNA ความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V_1 - V_3 โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ 27F และ 520R ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท พบว่า DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดังภาพ 1 ทำ PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ TaKaRa SUPRECTM-PCR แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปทำการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งได้ลำดับเบส ดังภาพภาคผนวก ข แล้วนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F นำไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST โดยแสดงผลการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในตารางที่ 1

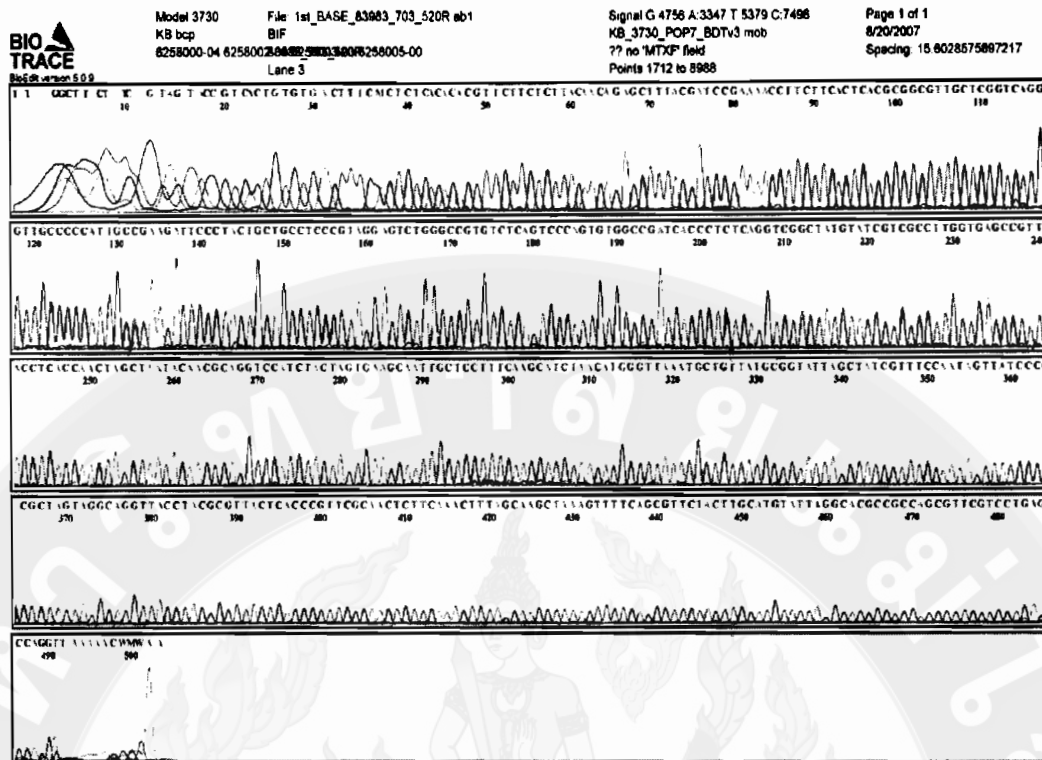
จากตารางที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย คือแบคทีเรียในجنัส *Bacillus* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคล้ายราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในجنัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*



ภาพที่ 1 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งลำดับเบส บริเวณ V_1 - V_3

Lane 1 คือ DNA marker

Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรีย



ภาพที่ 2 ภาพตัวอย่างลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย

```
>gb|EF040535.1| Bacillus sp. JS-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1472

Score = 866 bits (960), Expect = 0.0
Identities = 480/480 (100%), Gaps = 0/480 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG 60
Sbjct 4   GGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG 63

Query 61  ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA 120
Sbjct 64  ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA 123

Query 121 GCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGT 180
Sbjct 124 GCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGT 183

Query 181  CACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGAATGGCTCACCAAGGCG 240
Sbjct 184  CACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGAATGGCTCACCAAGGCG 243

Query 241  ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 300
Sbjct 244  ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA 303

Query 301  CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC 360
Sbjct 304  CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC 363

Query 361  GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG 420
Sbjct 364  GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG 423

Query 421  CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 480
Sbjct 424  CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC 483
```

ภาพที่ 3 ตัวอย่างชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรีย PB014 ที่นำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสของ primer 27F ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit

ตารางที่ 1 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ
น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
1	MJUT011	<i>Bacillus pumilus</i>	EU311209	491/495	99.2
2	MJUT019	<i>Bacillus megaterium</i>	DQ833751	489/492	99.4
3	MJUT026	Uncultured Bacilli bacterium	EF698019	482/482	100
4	MJUT033	<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF523245	492/499	98.6
5	MJUT036	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AB301017	490/491	99.8
6	MJUT067	<i>Bacillus cereus</i>	EU283326	495/497	99.6
7	MJUT071	<i>Bacillus cereus</i>	EF633270	488/490	99.6
8	MJUT074	<i>Bacillus</i> sp.	EU584514	501/505	99.2
9	MJUT075	<i>Bacillus megaterium</i>	EU221388	465/467	99.6
10	MJUT076	<i>Bacillus cereus</i>	DQ517909	494/495	99.8
11	MJUT108	<i>Bacillus fusiformis</i>	EF472269	441/509	86.6
12	MJUT109	<i>Bacillus fusiformis</i>	EF472269	416/503	82.7
13	MJUT112	<i>Bacillus subtilis</i>	EU334510	491/493	99.6
14	MJUT113	<i>Bacillus</i> sp.	EF503532	479/482	99.4
15	MJUT118	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AB301017	490/493	99.4
16	MJUT119	<i>Bacillus cereus</i>	EF633205	489/495	98.8
17	MJUT120	<i>Bacillus subtilis</i>	EF472266	496/497	99.8
18	MJUT122	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/495	99.4
19	MJUT125	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	EU026426	747/799	93.5
20	MJUT130	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB364957	473/474	99.8
21	MJUT133	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	491/493	99.6
22	MJUT136	<i>Bacillus</i> sp.	EU365432	492/496	99.2
23	MJUT137	<i>Bacillus</i> sp.	AJ809499	496/499	99.4
24	MJUT138	<i>Pseudoburkholderia malthae</i>	DQ490985	483/490	98.6
25	MJUT139	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	494/497	99.4
26	MJUT143	<i>Bacillus subtilis</i>	AY808064	496/497	99.8
27	MJUT151	<i>Bacillus pumilus</i>	AF260751	494/497	99.4

ตารางที่ 1 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ
น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
28	MJUT162	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	491/492	99.8
29	MJUT164	<i>Bacillus subtilis</i>	EF472266	492/493	99.8
30	MJUT165	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	490/491	99.8
31	MJUT170	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	487/491	99.2
32	MJUT171	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	490/492	99.6
33	MJUT172	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	AB184676	463/471	98.3
34	MJUT178	<i>Streptomyces chartreusis</i>	AB184839	458/464	98.7
35	MJUT197	<i>Streptomyces chartreusis</i>	AB184839	452/455	99.3
36	PB001	<i>Bacillus</i> sp.	EF040535	480/480	100
37	PB002	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	499/501	99.6
38	PB003	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	494/497	99.4
39	PB004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF176772	495/496	99.8
40	PB005	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	493/495	99.6
41	PB006	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	494/495	99.8
42	PB007	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
43	PB008	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	480/480	100
44	PB009	<i>Bacillus</i> sp.	EU365432	497/501	99.2
45	PB010	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/493	99.6
46	PB011	<i>Bacillus subtilis</i>	EU294413	491/493	99.6
47	PB012	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
48	PB013	<i>Bacillus pumilus</i>	EU327994	494/498	99.2
49	PB014	<i>Bacillus</i> sp.	EF040535	493/495	99.6
50	HPB015	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/496	99.2
51	HPB016	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	492/496	99.2
52	HPB017	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	494/498	99.2
53	HPB018	<i>Bacillus subtilis</i>	EU334106	488/492	99.2
54	HPB019	<i>Bacillus subtilis</i>	EF530208	495/500	99.0

ตารางที่ 1 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ
น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
55	HPB020	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	495/497	99.6
56	HPB021	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	495/497	99.6
57	HPB022	<i>Bacillus subtilis</i>	EF530208	499/502	99.4
58	HPB023	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU256502	494/498	99.2
59	HPB024	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	491/494	99.4
60	HPB025	<i>Bacillus subtilis</i>	EU489517	493/496	99.4
61	HPB026	<i>Bacillus</i> sp.	EU365432	493/494	99.8
62	HPB027	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	489/492	99.4
63	HPB028	<i>Bacillus subtilis</i>	EF617316	496/497	99.8
64	PW32	<i>Bacillus cereus</i>	DQ517909	492/493	99.8
65	PW3/2	<i>Enterobacter</i> sp.	EU081851	475/486	97.7
66	PW35/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	487/491	99.2
67	SA12/1	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	473/477	99.2
68	SA38/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/489	98.8
69	PW5/2	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	472/478	98.7
70	SA6/3	Uncultured bacterium	EF613004	476/478	99.6
71	PW35/1	<i>Enterobacter</i> sp.	DQ988939	472/473	99.8
72	PW10/2	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	AY043378	480/485	98.9
73	SA7/1	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	AY043378	489/496	98.6
74	SA6/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/490	98.6
75	PW5/1	Uncultured bacterium	EF613004	471/475	99.2
76	PW27	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	479/488	98.2
77	SA11/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	483/491	98.4
78	SA38/4	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	486/490	99.2
79	SA2/5	<i>Acinetobacter</i> sp.	AY273199	482/490	98.4
80	PW35/3	<i>Pantoea agglomerans</i>	DQ536506	486/489	99.4
81	KS21	<i>Bacillus thuringiensis</i>	FJ358616	500/500	100

ตารางที่ 1 แสดงผลการจำแนกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และ
น้ำมัน โดยวิธี 16S rDNA sequencing (ต่อ)

No.	ไอโซเลท	ชนิดจุลินทรีย์	Accession No.	bp/bp	% Homology
82	KS23	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ833758	500/500	100
83	KS27	<i>Bacillus cereus</i>	EU244736	496/498	99.6
84	KS28	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ234439	500/500	100
85	KS30	<i>Bacillus thuringiensis</i>	FJ236808	498/500	99.6
86	KS37	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	FJ237498	500/500	100
87	KS38	<i>Bacillus sphaericus</i>	DQ833758	499/499	100
88	KS44	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ234439	500/500	100
89	S27	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ222551	500/500	100
90	SO5	Uncultured bacterium clone	EU769179	500/500	100
91	SO7	Uncultured bacterium clone	EU769179	500/500	100
92	W17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ222551	500/500	100

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์เพื่อใช้ในงานทางสิ่งแวดล้อม เพื่อให้มีการเก็บข้อมูลของจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างเป็นระบบและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งสามารถเผยแพร่ต่อบุคคลทั่วไปให้เข้าถึงข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไว้ทางระบบเครือข่ายทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ทางสิ่งแวดล้อม คือ สามารถย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย รวบรวมได้ทั้งสิ้น 120 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน รวบรวมได้ทั้งสิ้น 110 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ 3 รูปแบบด้วยกัน คือ การเก็บบนอาหารร่วนผิวหน้าเอียง การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C และการเก็บรักษาโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารในขยะ น้ำเสีย และน้ำมัน เพื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธี 16S rDNA sequencing รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลท พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายขยะและน้ำเสียส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียคลัสตราในกลุ่มของแอคติโนมัยซีต *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารในน้ำเสียอีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันนั้น พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* และ *Bacillus*

เอกสารอ้างอิง

สมบุรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Kirsop,B.E. and J.J.S Snell. 1984. **Maintenance of Microorganisms : A Manual of Laboratory Method.** Academic press, INC, London.

Niamsup, P., Sujaya, I.N., Tanaka, M., Sone, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Lumyong, S., Assavanig, A., Asano, K., Tomita, F. and Yokota, A. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 263-268.

Robert, D., W. Hooper, M. Greenwood. 1995. **Practical food microbiology.** Public Health Laboratory Service, London.

Takamatsu, S. 1998. PCR Applications in Fungal Phylogeny. Pp..125-152. In: **Applications of PCR in Mycology.** CAB International, New York.

ภาคผนวก ก

คู่มือการใช้งานฐานข้อมูลจุลินทรีย์



The logo of Maejo University is a large, circular emblem in the background. It features a central figure, likely a deity or historical figure, surrounded by flames and a dragon-like creature. The text "มหาวิทยาลัยแม่โจ้" is written in Thai script along the top inner edge, and "MAEJO UNIVERSITY" is written in English along the bottom inner edge. Two star-like symbols are positioned on the left and right sides of the emblem.

**Maejo University
Culture Web Application**

User Manual

Version 1.1

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Revision History

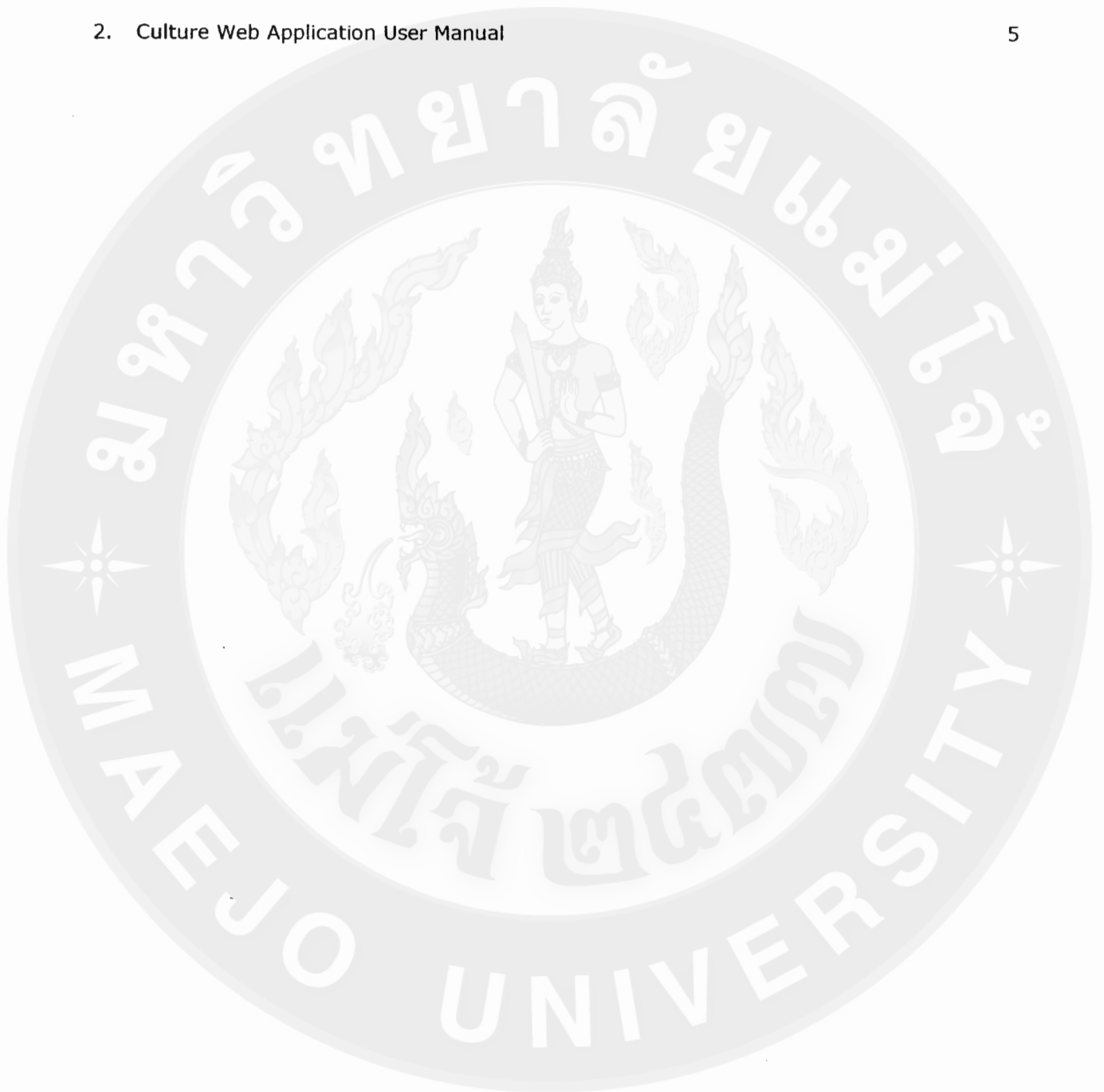
Date	Version	Description	Author
9 August 2007	1.0	Create Document	Wasu Niumsup
13 August 2007	1.1	Update Document	Wasu Niumsup



MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Table of Contents

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. How to Start Server | Error! Bookmark not defined. |
| 2. Culture Web Application User Manual | 5 |

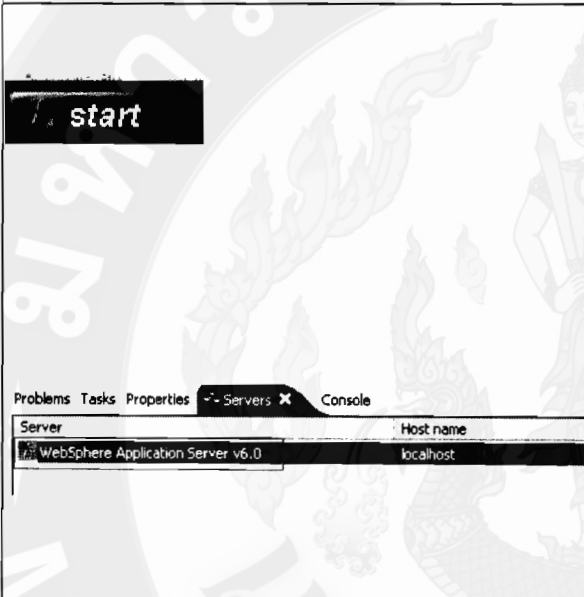


MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

How to Start Server

1. Start Server

1.1 Start Web Server

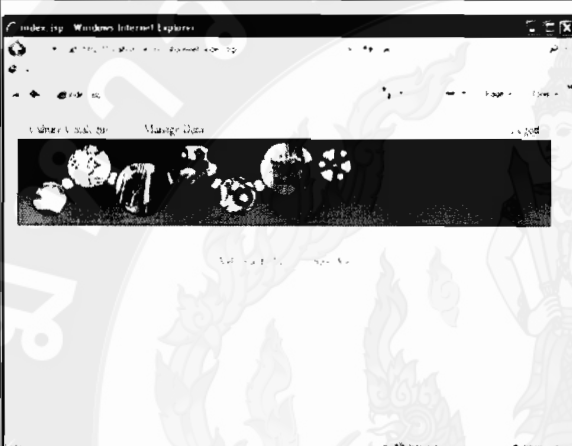
Screen	Description				
1.1.1 Start Web Server					
 The screenshot shows the IBM Rational Application Developer V6.0 interface. At the top, there is a 'start' button. Below it, the 'Problems Tasks Properties Servers Console' tabs are visible. The 'Servers' tab is active, showing a table with the following content: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Server</th> <th>Host name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>WebSphere Application Server v6.0</td> <td>localhost</td> </tr> </tbody> </table>	Server	Host name	WebSphere Application Server v6.0	localhost	Start Windows - Click "Start" on Task bar - Choose Programs > IBM Rational > IBM Rational Application Developer V6.0 > Rational Application Developer - Enter "D:\Workspace" as Workspace - Click "OK" - Click "Servers" Tab on the Bottom window - Select "WebSphere Application Server v6.0" - Click  to Start Server - Wait until process complete
Server	Host name				
WebSphere Application Server v6.0	localhost				

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

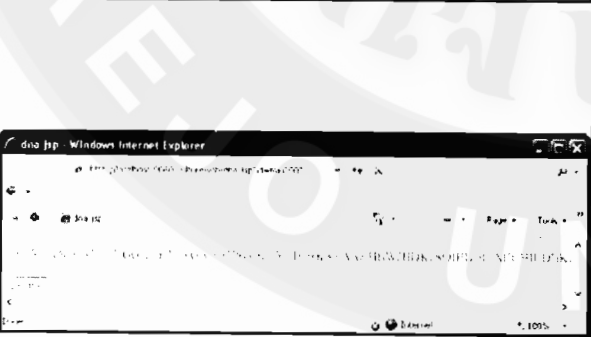
Culture Web Application User Manual

2. User Manual

2.1 View Culture

Screen	Description
2.1.1 View Culture	
	- Open IE Browser - Type "http://localhost:9080/cultureweb/" as URL - The Culture Web Application will displayed
	- Click "Culture Catalogue" to view Culture list - Select Dropdown to select type of culture - Enter criteria for advance search - Click "Search" - Search result will displayed - Click on the culture MJU Code or Culture Name to view that culture detail

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- Culture detail will displayed
	- Click on Growth Condition Name to view the culture Growth Condition - Growth Condition will displayed - Click "Back" to go to previous screen
	- To view the culture DNA Sequence click "click to view DNA Sequence" - New window will popup and show the culture DNA Sequence - Click "close" to close this window

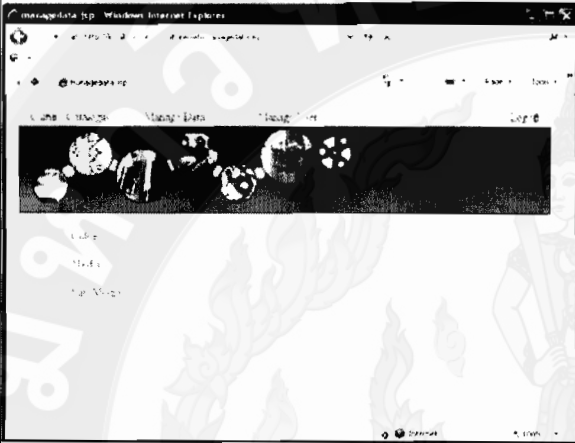
MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

2.2 Login

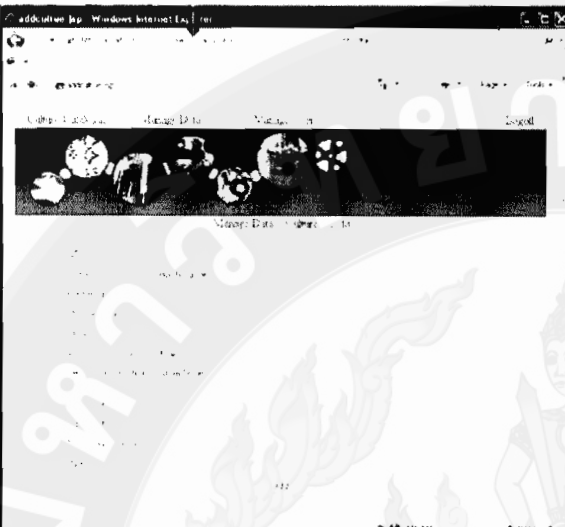
Screen	Description
2.2.1 Login	
	- Click "Login" on the top right - The Login Page will displayed
	- Enter Username and Password - Click "Login" - The menu on the top will display by the role of the user - Click "Logoff" if you want to Logoff

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

2.3 Manage Data

Screen	Description
2.2.1 Manage Culture	
	- Click "Login" on top of the screen - The Manage Data Page will displayed
	- Click "Culture" to manage culture - Culture list will displayed - You can use search to find culture

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- To add new culture click "Add" - The Add Culture page will displayed - Fill the Add Culture form - Click "Add" button to add new culture
	- To update culture detail click "Update" behind the culture you want to update - The Update Culture page will displayed

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CUI.TURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	- Edit detail you want to update - Click "Update" button to update the culture
	- To delete culture click "Delete" behind the culture you want to delete - Te Delete Culture page will displayed

MJU.CULTURE	Version: 1.1
User Manual	Date: 13 August 2007
MJU.CULTURE.UserManual.Doc	

Screen	Description
	Click "Delete" button to delete the culture

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสารในขยะ น้ำเสีย
และน้ำมัน

1. MJUT011

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
AGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
GTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGGCCCCGCGGTA3'

2. MJUT019

5'GCTATAATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGA
AGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTA
TCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACAAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

3. MJUT026

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAG
 CTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGG
 GAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCACCCCCCCCCGCGGT3'

4. MJUT033

5'GCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGG
 CTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCACCCCCCCCCGCGGTA3'

5. MJUT036

5'GCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

6. MJUT067

5'TCCGCCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCG3'

7. MJUT071

5'GGGGTGCTATAATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTC
GGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCACCGGCCGCGA3'

8. MJUT074

5'GGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC
GGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGAT
GGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCG3'

9. MJUT075

5'TCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGAC
 GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
 TCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAG
 ATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
 CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTC
 TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACC3'

10. MJUT076

5'AGCGGGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCG
 GGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
 GCTTCGGCTGTCATTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGG
 CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
 AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGT
 TGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC3'

11. MJUT108

5'GGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTATCT
 GCTGGCCCTATTAGAAGGGCCCCCGCCCATTTACTAATTGGGGAAGGAACCGCTCAA
 CCAGGGCACCATGCCTAACCCAACTGGAAGGGTGGTCCGCCAACTGGGACTGGAAA
 CCCGCCCAAACCTCCTACCGGAGGCAGCAGTAGGGAATCCTCCCAATGGGCGAAAGCCT
 GATGGAAGAACCGCGCCTGAATGAAGAAAGGTTTCGGATCGTAAAATCTGGTGGAAGG
 GAAGAACAGTACAGTAGTACTGGCTGTCCTTGACCGTACTTATAGAAAGCCACGCTACTA
 CGTGCAGCCGCCAGCGTAANACGTAG3'

12. MJUT109

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCTGCT
 GGCCCTATAAGAAGGGCCCCCGCCCCCTTAATAATTGGGGAAGGAACGGCTCCCCCA
 GGGCAACAAGCCTAACCCAACTGGAAAGGTGAACCGCCCCCCTGGGAATGAAAACCC
 GCCCCAAATCCTACCGGAAGGCACCATAAGGAATCCTCCCCCATGGGCCAAAGCCTGG
 AGGAACCACCCCCCCTGGATGAAAAAAGGTTTCCGAACCTAAACTCTGGTGGAAGGG
 AAAAACCAGTACCGTAATAACTGGGTGGACCTTTGCCGGACCTTAATTAAGCCCCGG
 GTAAATACCTGGCCACCGGCCGCGGTAA3'

13. MJUT112

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCGGCCGCGATAA3'

14. MJUT113

5'CCTAATAAGTAGCATGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCCTCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCGCGGT3'

15. MJUT118

5'TAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCCGGCCCGCGGTA3'

16. MJUT119

5'CTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGT
CACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCACCCCGCCCCGCGGTAA3'

17. MJUT120

5'GCGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCC3'

18. MJUT122

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

19. MJUT125

5'GGGTGCCTATAATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTC
 GGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
 CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACAGGCCGCGGT3'

20. MJUT130

5'GGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAA
 ACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAC
 GCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
 GACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA
 GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA
 GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAAAT
 TCGTGCCAGCAA3'

21. MJUT133

5'TGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGG3'

22. MJUT136

5'GCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

23. MJUT137

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG'
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

24. MJUT138

5'GCGCAGCCTTAACATGCAGTCGACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACATATCGGAACGTGCCCTGGAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ACTAGCTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGC
TCGTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
CGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAG
CAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAGAAA
TCCCATCCCTGAATACGGGGTGGGGATGACGGTACTGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
TACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

25. MJUT 139

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

26. MJUT143

5'CATGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

27. MJUT151

5'GGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGT
TTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCACCGCCCCG3'

28. MJUT162

5'GCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

29. MJUT164

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

30. MJUT165

5'GCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

31. MJUT170

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
 GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
 CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTA ACTACGTGCCACGGCCCCGCGGTA3'

32. MJUT171

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 GGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
 ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGCAGTAAA3'

33. MJUT172

5'GCGCGTGCTACACATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
GGTCTAATACCGGATAACAACCACTGACCGCATGGTCGGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGG
TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCG
CAGGTA3'

34. MJUT178

5'ATGGCGCTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
GGTCTAATACCGGATAAACAACCTCCTGTCCTCCTGGACGGGGGTAAAAGCTCCGGCGGT
GAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG
CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA
GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GT3'

35. MJUT197

5'GCGCTGCTTACACATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGG
GTCTAATACCGGATAAACAACCTCCTGTCCTCCTGGACGGGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGA
AGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCCGG3'

36. PB001

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 AGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
 GTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAACCTACGTGCACC3'

37. PB002

5'CTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

38. PB003

5'TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCG3'

39. PB004

5'CCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGT3'

40. PB005

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGT3'

41. PB006

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGGCCGCGGT3'

42. PB007

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGAGGCCCGCGGTA3'

43. PB008

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCACCCCCCCCCCGGTAG3'

44. PB009

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

45. PB010

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCTCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGAAG3'

46. PB011

5'GCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGATAA3'

47. PB012

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGGCGCGGTA3'

48. PB013

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGTA3'

49. PB014

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGGCCCGCGGTA3'

50. HPB015

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCGGT3'

51. HPB016

5'GTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCACCGGCCGCGGGTA3'

52. HPB017

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCCGGCCGCGGTA3'

53. HPB018

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCACCGGGCCGCGGT3'

54. HPB019

5'CTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
 CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCACAGGCCGCGGTA3'

55. HPB020

5'GCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGCCGCGGTA3'

56. HPB021

5'GGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

57. HPB022

5'GGGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTC
 GGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
 CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
 CACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCGCGG3'

58. HPB023

5'GCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
 GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
 CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAACCTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

59. HPB024

5'CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
 GCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTA
 CCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
 CTAACCTACGTGCCACCGGCCCGCGGTA3'

60. HPB025

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

61. HPB026

5'GCGGGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
 AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGC
 TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
 CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
 TTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCCG3'

62. HPB027

5'TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC
 TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
 CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
 GCTAACTACGTGCCACCGGCCCGCGGT3'

63. HPB028

5'CGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCCGCGCGGTA3'

64. PW32

5'CCGGCTGCCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG
 CTTCCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
 AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTT
 GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
 AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGGC3'

65. PW3/2

5'GCGCAGGCTACACATGCAGTCGAGCGGCAGCACAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGC
 GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
 GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
 TCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTA
 GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACG
 GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
 TGCACCCATGCCGCGTGATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA
 GGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGCAAAAGAAGCACCGGC
 TAACTCCGTGCCAGCCGGCCGCGATA3'

66. PW35/2

5'GCGGCAGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGGGGAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAA
 GGGATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCG
 CTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
 CGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
 CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
 GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
 TCTGTGCCAGCAGGCCGCGGTA3'

67. SA12/1

5'GGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
 GATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
 ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
 ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGAGCCCGCGGTA3'

68. SA38/2

5'CGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
 CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
 GATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTA
 ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
 ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
 TGCCAGAGGCCGCGGTA3'

69. PW5/2

5'GCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGA
 TGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAAT
 AGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
 CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
 TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACACTGAA
 AACAGCAGCCGCGGTA3'

70. SA6/3

5'GCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
 GGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGC
 TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
 GATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCC
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
 ACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
 GTGCCAGCAGGCCGCGGTA3'

71. PW35/1

5'GCAGCTACACATGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGG
 CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAC
 GGATGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGC
 CATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGA
 CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
 CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAG
 GTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT
 CCGTGCCAGCAG3'

72. PW10/2

5'CGCTGCTTACCATGCAGTCGAACGGCAGCGGGGGAAGCTTGCTTTCCTGCCGGCGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGA
AAGATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCA
TGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGA
AATGGCTCTGGTTAATACCCGGAGTTGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAA
CTACGTGCCAGCCGCCCGCGGTGTCATC3'

73. SA7/1

5'GCGGCTGCTTACCATGCAGTCGACGGCAGCGGGGGAAGCTTGCTTTCCTGCCGGCG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTC
GAAAGATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCT
CATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAA
GAAATGGCTCTGGTTAATACCCGGAGTTGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGTA3'

74. SA6/4

5'GGCAGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGG
GATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTA
ATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
ATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
CTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
TGCCACCGCCCGCGGTA3'

75. PW5/1

5'GCGGCAGCTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGG
ATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAA
TAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG
CCAGCCGCCCCGCGGTA3'

76. PW27

5'GGCAGGCTTACCATGCAGTCCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAG
GGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGC
TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC
GATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
ACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
GTGCCAGAGCCCGCGGTGAATTAAG3'

77. SA11/4

5'GCAGGCTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGA
TGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAAT
AGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
CTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACT
TTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG
CCAGAGGCCCGCGGT3'

78. SA38/4

5'GGCGGCGGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAA
 AGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC
 GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
 ACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
 CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
 GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
 TCTGTGCCAGCAGGCCGCGGATA3'

79. SA2/5

5'CTGCCGCCGGCTTACCATGCAGTCGAGCGGGGGAAGGTAGCTTGCTACTGGACCTAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAA
 AGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC
 GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCG
 ACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
 CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG
 GCTACTTTAGATAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAAC
 TCTGTGCCAGCCGCCCGCGGTA3'

80. PW35/3

5'TTGGGCAGGCCTACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCCTCGGGT
 GACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACT
 ACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGG
 GCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCAC
 CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACA
 CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
 GATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTAGCGGG
 GAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC
 GGCTAACTCCGTGCCAGCCGCCGCGGT3'

81. KS21

5'CGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG3'

82. KS23

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCG
GCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAA
GGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT3'

83. KS27

5'GGCCGCGTGCCTTCTTCATGCAAGTCGAGCGAATGGATTCAGAGCTTGCTCTTATGA
AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAA
GGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA3'

84. KS28

5'GGGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTT
CGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG3'

85. KS30

5'CGGCGTGCCTTATTACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTTAAGAGCTTGCTCTTATGAAG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTC
CGGGAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTGAAATTGAAAGG
CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG3'

86. KS37

5'CGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCG
GCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAA
GGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG3'

87. KS38

5'GCGTGCCTTCTACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGG
 GAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGT
 TTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA
 AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT
 GTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC3'

88. KS44

5'TGGCGGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGT
 TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
 GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGAC
 GGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
 GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
 GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTG
 TTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAAGTGGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGA
 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC3'

89. S27

5'GTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
 GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
 ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT3'

90. SO5

5'GCAGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGCAGACGGGTGAG
 TAACGCGTGGGAACGTACCATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACC
 GTATGAGCCCCCTTTAAAATTTACAGGAATCATAAAATGCCCTGGCATTATGGGGGGG
 AAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC
 CTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCA
 AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCA
 CCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGT3'

91. SO7

5'GCAGCTTACACATGCAGTCGAGCGGGCCCTTCGGGGTCAGCGGCAGACGGGTGAGT
 AACGCGTGGGAACGTACCATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCG
 TATGAGCCCCCTTTAAAATTTACAGGAATCATAAAATGCCCTGGCATTATGGGGGGGA
 AAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
 TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTAC
 CGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGTT3'

92. W17

5'GGTGCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTT
 CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTC
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
 GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG3'