



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103571776 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201310491340. 4

审查员 樊颖

(22) 申请日 2013. 10. 18

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8198 2013. 09. 17

(73) 专利权人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区十三大街 29 号

(72) 发明人 张同存 罗学刚 古向超 张瑶  
王重喜

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209

代理人 赵瑶瑶

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 15/55(2006. 01)

C12N 9/14(2006. 01)

C12R 1/25(2006. 01)

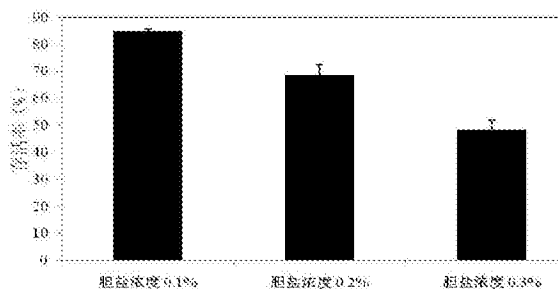
权利要求书1页 说明书6页  
序列表9页 附图2页

(54) 发明名称

高耐胆盐能力的菌株及胆盐水解酶基因

(57) 摘要

本发明公开了一种高耐胆盐能力的菌株及胆盐水解酶基因, 菌株的保藏编号为 CGMCCNo. 8198, 具有很强的耐酸、耐胆盐、硝酸盐还原等能力, 并扩增出该菌株的三种胆盐水解酶基因, 并对其进行了克隆、测序和异源表达, 由此产生的胆盐水解酶具有很高的活性。本发明的菌株和胆盐水解酶可用于食品、医药、农业等领域, 如用作食品及饲料发酵剂、微生态制剂、药物表达载体、饲料添加剂等, 胆盐水解酶可用于开发为重组蛋白产品, 亦可用作乳酸菌基因工程表达系统的筛选标记, 用于乳酸菌菌种的分子改造。



1. 一种高耐胆盐能力的菌株,其特征在于:所述菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),保藏编号为 CGMCC No. 8198,于 2013 年 9 月 17 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址,中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院。

## 高耐胆盐能力的菌株及胆盐水解酶基因

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,涉及产胆盐水解酶的乳杆菌属的新菌株,以及该菌株分离得到的相关基因。

### 背景技术

[0002] 益生菌是指当摄入一定数量,能以活菌状态到达胃肠道,通过调节肠道菌群组成,发挥对人体或动物健康起促进作用的单一或特定微生物的混合物。作为人和动物胃肠道内重要的生理性有益菌,益生菌具有维持胃肠道正常的微生态平衡、抑制病原菌的入侵与感染、增强机体免疫力、预防和抑制肿瘤发生、降低胆固醇以及抗氧化等作用。益生菌目前仍然以乳酸菌为主。

[0003] 胆固醇存在于人和动物的血液、脊髓及脑中,正常人血清胆固醇含量为 1.50-2.50g/L。研究表明,血清中胆固醇含量过高是引起动脉粥样硬化、冠心病、高血压等心脑血管疾病的重要因素。目前心脑血管疾病是引起人们死亡的主要杀手,而且逐年呈上升趋势。同时,人体总胆固醇浓度与膳食脂质摄入之间有着密切的关系,因此降低食品中胆固醇水平关系到人类的健康。

[0004] 在肝脏中,胆固醇的主要去路是转变成胆酸,胆酸衍生的甘氨酸胆酸和牛磺胆酸是人类的主要胆汁酸,胆汁酸均以钠盐或钾盐形式存在,即胆汁酸盐,简称胆盐,具有促进脂类的消化与吸收和抑制胆汁中胆固醇析出的作用。胆汁酸可分为两类:一类是胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸和石胆酸等游离胆汁酸;另一类是游离胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合形成的结合胆酸,主要有甘氨酸胆酸,牛磺胆酸,甘氨酸鹅脱氧胆酸和牛磺鹅脱氧胆酸,是人胆汁中的主要胆汁酸。

[0005] 国内外一些研究表明,乳酸菌能够降低发酵食品和人体血清胆固醇的水平,尤以乳杆菌降低人体血液胆固醇水平的研究受到了越来越广泛的关注和重视。目前的研究证实,乳杆菌降低血液胆固醇水平与胆盐水解酶的存在有一定的关系。胆盐水解酶(Bile salt hydrolase, BSH)是微生物(主要是乳酸菌)生长、繁殖过程中产生的一种代谢物,它能水解结合形胆酸盐,将其转变成氨基酸和游离胆酸盐,造成吸收效率降低,从而使大量的游离胆酸盐从粪便中排出。胆固醇是形成胆酸的前体物质,排出体外的部分游离胆酸盐需要胆固醇的转化来弥补,从而加速了胆固醇的分解代谢,使胆固醇浓度的降低,促进血清中胆固醇水平的降低。

[0006] 目前,针对微生物中胆盐水解酶的作用机理还没有确切的定论,大多是几种假设,主要是以吸收同化作用和共沉淀作用为主。但根据实验结果推测,乳酸菌降胆固醇的机理可能是由多种机制协同作用的结果。胆盐水解酶基因 bsh 编码区的调节在各个种属之间是有所差异的,BSH 酶的大小、亚基组成、最适 pH 值、底物特异性及动力学性质等变化也较大。更有趣的是在有些菌株,如植物乳杆菌 WCFS1 中同时存在 4 个 bsh 同源基因,这对于研究 bsh 基因的功能具有重要的意义。因此,明确不同菌株或同一菌株不同 BSHs 的功能和作用机制对于揭示乳酸菌的耐胆盐作用机理及开发降胆固醇发酵乳制品具有重要的实用价值。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供高耐胆盐能力的菌株,该菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) CGMCCNo. 8198 菌株,已于 2013 年 9 月 17 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院。

[0008] 本发明还提供三种来自 *L. plantarum* CGMCCNo. 8198 的胆盐水解酶 (BSHs) 及其基因 *bsh2*、*bsh3*、*bsh4*。以 *L. plantarum* CGMCCNo. 8198 基因组为模板,克隆三种 *bshs* 基因,连接到大肠杆菌表达载体 pET22b 中,并在 *E. coli* Rosetta (DE3) 中诱导表达,所得到的三种胆盐水解酶具有相对很高的水解结合型胆酸盐的能力。

[0009] 本发明实现目的的技术方案如下:

[0010] 一种高耐胆盐能力的菌株,所述菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),保藏编号为 CGMCCNo. 8198,于 2013 年 9 月 17 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),地址,中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院。

[0011] 一种胆盐水解酶基因,基因序列如序列 1 所示。

[0012] 一种胆盐水解酶基因,基因序列如序列 2 所示。

[0013] 一种胆盐水解酶基因,基因序列如序列 3 所示。

[0014] 一种胆盐水解酶基因组,包括如序列 1、2、3 所示基因序列。

[0015] 一种胆盐水解酶,由高耐胆盐能力的菌株发酵获得。

[0016] 一种产胆盐水解酶的基因工程菌,包括胆盐水解酶基因组中任一基因。

[0017] 上述工程菌发酵获得胆盐水解酶。

[0018] 本发明的优点和积极效果如下:

[0019] 1、本发明提供一种高耐胆盐能力的菌株,通过实验发现本菌株具有很强的硝酸盐还原能力和耐酸能力,在 pH 为 5.0 ~ 8.0 范围内均能较好的生长,在含有 0.3% 胆盐的 MRS 培养基中培养 4h 存活率仍能达到 48.32%,属于具有很高的耐胆盐能力的菌株。

[0020] 2、本发明还提供了该菌株的三种胆盐水解酶基因,并对其进行了克隆、测序和异源表达,由此产生的胆盐水解酶具有很高的活性。

[0021] 3、本发明的菌株和胆盐水解酶可用于食品、医药、农业等领域,如用作食品及饲料发酵剂、微生态制剂、药物表达载体、饲料添加剂等,胆盐水解酶可用于开发为重组蛋白产品,亦可用作乳酸菌基因工程表达系统的筛选标记,用于乳酸菌菌种的分子改造。

## 附图说明

[0022] 图 1 为本发明 *L. plantarum* CGMCCNo. 8198 在不同浓度胆盐下的存活率;

[0023] 图 2 为本发明三种胆盐水解酶在 *E. coli* Rosetta (DE3) 中的诱导表达;

[0024] 图 3 为本发明三种胆盐水解酶水解不同结合型胆盐的能力;

[0025] 图 4 为本发明不同浓度胆盐对 *bsh2-4* 表达的调控。

## 具体实施方式

[0026] 下面结合实施例,对本发明进一步说明,下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0027] 以下实施例分别从菌株的获得、该菌株胆盐水解酶基因的分离获得以及胆盐水解酶的表达三个方面来说明本发明的技术方案,具体内容如下:

[0028] 一、*L. plantarum*CGMCCNo. 8198 的分离鉴定

[0029] 以下实验均在无菌条件下操作。

[0030] 1. 菌株的富集

[0031] 称取青贮饲料 5g,加入 20mL 无菌生理盐水均质,将得到的匀浆适当稀释后取 100  $\mu$ L 涂布于含有 0.3% 猪胆盐的 MRS 平板上,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养箱倒置培养 36-72h,观察菌落生长状况。

[0032] 2. 菌株的分离

[0033] 挑取 1 中的菌落,涂于载玻片上,革兰氏染色,观察菌体形态特征,选取革兰氏阳性菌作为目的菌株。

[0034] 3. 菌株的纯化

[0035] 挑取 2 中所得的菌落在含有 0.3% 猪胆盐的 MRS 平板上划线,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24-36h,挑取单菌落镜检,直至所得的菌株为纯菌。

[0036] 4. 菌株的鉴定

[0037] 对 3 中获得的纯菌进行生理生化实验研究,发现该菌具有很强的硝酸盐还原能力和耐酸能力,在 pH 为 5.0 ~ 8.0 范围内均能较好的生长。在含有 0.3% 胆盐的 MRS 培养基中培养 4h 存活率仍能达到 48.32% (如图 1 所示),这在文献报道中,属于具有很高的耐胆盐能力的菌株。对该菌株进行 16SrRNA 鉴定,确定为乳杆菌属中的一株新的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),该菌株已于 2013 年 9 月 17 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),保藏号为 CGMCCNo. 8198,地址:中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院。在 MRS 琼脂培养基上生长 30h,形成乳白色、圆形大菌落,边缘光滑,中央凸起,具有一定的黏性,属于兼性厌氧菌,在显微镜下观察革兰氏染色阳性,呈杆状。

[0038] 该菌株在培养过程中使用 MRS 培养基。

[0039] 二、*L. plantarum*CGMCCNo. 8198 的胆盐水解酶基因 (bsh) 的克隆表达

[0040] 将已经获得的 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 具有很高的耐胆盐能力,表明该菌株可以高产胆盐水解酶,从而将结合型胆盐水解,提高自己的存活率,本发明通过引物扩增出 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 中的胆盐水解酶基因。

[0041] 1. bsh 基因的克隆

[0042] 以 GenBank 中已公布的 *L. plantarum*WCFS1 (NC\_004567.2) 的胆盐水解酶基因为模板设计引物(如表 1 所示),以 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 的基因组为模板,利用 PCR 扩增 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 中相关的胆盐水解酶基因。PCR 体系如表 2 所示,

[0043] 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C,5min;95 $^{\circ}$ C,30s;退火 59 $^{\circ}$ C,40s;72 $^{\circ}$ C,1min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳显示获得 3 个不同大小的 DNA 片段,分别命名为 bsh2、bsh3 和 bsh4。

[0044] 表 1PCR 引物序列

Primer no.	Primer sequence (from 5'end to 3'end)
P1	CGGCTGGATCCGATGTGCACTAGTCTAAC
P2	ATACTCGAGATGGGCCGCTGGCAAGGTG
[0045] P3	CGTGGATCCGATGTGTACTAGTTTAAACGATTC
P4	TGTCTCGAGGTTTGCTAACCGGAACTGTTGG
P5	CTTGGATCCGATGTGTACCAGCTTAACTTATC
P6	ATACTCGAGATCGGCAGGGAAGAGGTACGGT

[0046] 表 225  $\mu$  LPCR 反应体系

组分	体积 ( $\mu$ L)
ddH <sub>2</sub> O	18
10 $\times$ Taq 酶缓冲液	2.5
[0047] dNTP (each 10 mM)	1
模板基因组	1
上游引物 (10 mM)	1
下游引物 (10 mM)	1
Taq 聚合酶 (5U/ $\mu$ L)	0.5

[0048] 2. 载体 pET22b-bsh 的构建

[0049] 将基因片段 bsh2、bsh3 和 bsh4 分别连接到表达载体 pET22b 上,连接体系如表 3 所示,构建成表达载体 pET22b-bsh2、pET22b-bsh3 和 pET22b-bsh4。16 $^{\circ}$ C 连接过夜,取 10  $\mu$  L 连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,挑取阳性克隆提取质粒,用 XhoI 和 BamHI 进行双酶切验证,酶切体系如表 4 所示,验证正确后再将上述三个载体送往 Invitrogen (北京) 公司测序,结果如序列 1. 2. 3 所示,通过比较发现,本发明获得的基因与现有胆盐水解酶基因具有明显区别。

[0050] 表 3 质粒构建连接体系

组分	体积 ( $\mu$ L)
PCR 纯化产物	6.5
[0051] 线性化载体	2
T <sub>4</sub> DNA Ligase (1U/ $\mu$ L)	0.5
10 $\times$ T <sub>4</sub> DNA Ligase buffer	1

[0052] 表 4 质粒双酶切验证体系

组分	体积 ( $\mu$ L)
ddH <sub>2</sub> O	3
10 $\times$ Fastdigest Buffer	2
[0053] 质粒 DNA	3
<i>Xho</i> I (10 U/ $\mu$ L)	1
<i>Bam</i> HI (10 U/ $\mu$ L)	1

[0054] 3. 胆盐水解酶在大肠杆菌中的表达和分离纯化

[0055] 将 pET22b-bsh2、pET22b-bsh3 和 pET22b-bsh4 分别转化 E. coli Rosetta(DE3),

在 IPTG 的诱导下大量表达胆盐水解酶 BSH2、BSH3 和 BSH4 (如图 2 所示), 图 2 中第 1 道为未诱导的 Rosetta-pET22b, 第 2 道为诱导的 Rosetta-pET22b, 第 3 道为未诱导的 Rosetta-pET22b-bsh2, 第 4 道为诱导的 Rosetta-pET22b-bsh2, 第 5 道为未诱导的 Rosetta-pET22b-bsh3, 第 6 道为诱导的 Rosetta-pET22b-bsh3, 第 7 道为未诱导的 Rosetta-pET22b-bsh4, 第 8 道为诱导的 Rosetta-pET22b-bsh4。诱导后的菌体超声破碎, 离心取上清, 利用镍柱亲和层析分离纯化三种蛋白。

[0056] 上述三个基因工程使用 LB 普通培养基培养即可。

[0057] 4. 三种胆盐水解酶体外水解不同结合型胆盐的活力检测

[0058] 在 700  $\mu$ L 的反应缓冲液 (0.1M 磷酸盐缓冲液, pH6.0) 中加入 100  $\mu$ L 纯化后的胆盐水解酶, 100  $\mu$ L 结合型胆盐 (终浓度 10mM), 100  $\mu$ L 液体石蜡, 混合物在 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后加入 200  $\mu$ L 15% 的三氯乙酸终止反应。15000g 离心 10min, 取上清即为反应样品, 利用高效液相色谱检测反应样品中的氨基酸产量。1 个单位的胆盐水解酶活力定义为 1 分钟内水解底物产生 1nM 氨基酸所需要的酶。氨基酸的检测采用 2, 4-二硝基氟苯柱前衍生法, 检测波长 360nm, 流速 1mL/min, 进样量 20  $\mu$ L, 流动相为 0.05M 的乙酸钠和 50% 的乙腈。上述反应采用的结合型胆盐为甘氨脱氧胆酸钠 (GDCA) 和牛磺脱氧胆酸钠 (TDCA), 相对酶活为每毫克纯的胆盐水解酶 1 分钟内水解底物产生的氨基酸的量, 结果如图 3 所示。三种胆盐水解酶对 GDCA 和 TDCA 都有很高的水解能力, 以 BSH2 水解 GDCA 的能力最为突出。上述结果表明 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 本身高耐胆盐的能力是由它所产生的胆盐水解酶发挥作用的。

[0059] 三、不同浓度的胆盐对 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 胆盐水解酶表达的影响

[0060] 本发明采用 RT-PCR 的方法研究 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 胆盐水解酶的表达是否受生长环境影响。结果发现在 *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 的培养基中添加胆盐, 会上调 bsh 基因的表达, 而且对胆盐具有浓度依赖性。以第二部分克隆获得的三个胆盐水解酶基因 bsh2、bsh3 和 bsh4 为模板, 设计 RT-PCR 引物 (引物序列如表 5)。

[0061] 表 5 RT-PCR 引物序列

Primer no.	Primer sequence (from 5'end to 3'end)
P7	TGAGACCCGTATTATGTTC
P8	TTGGTTACTGTGAGGCTG
P9	GAACGGATTGCTGACTTG
P10	CGTATTGACGACTAGGATG
P11	TCCGCTGGCTACAAGAAG
P12	CAATCGGCAGGAAAGAGG
P13	AAGGCTGAAACTCAAAGG
P14	AACCCAACATCTCACGAC

[0063] *L. plantarum*CGMCCNo. 8198 生长到对数生长期时, 加入不同浓度的胆盐 (0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%), 继续培养 16h, 收集菌体, 提取总的 RNA, 逆转录成 cDNA。选取 16SrRNA 作为内标基因, 引物序列如表 5 中的 P13 和 P14。以 cDNA 为模板, bsh2 的引物为 P7 和 P8, bsh3 的引物为 P9 和 P10, bsh4 的引物为 P11 和 P12, 进行 PCR 扩增, 结果如图 4 所示。随着胆盐浓度的增加, bsh2-4 的表达量不断增加, 尤以 bsh2 和 bsh3 的表达量较高, 说明胆盐能

够上调 bsh 基因的表达,而且具有浓度依赖性。



[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 天津科技大学

&lt;120&gt; 高耐胆盐能力的菌株及胆盐水解酶基因

&lt;130&gt; 2013-10-16

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1017

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 基因 bsh2

&lt;400&gt; 1

atgtgcacta gtctaactta tacaatagc catggaggcc actctttagc tegtacaatg 60

gattttaacg ttgacttga gaccctgatt atgttcatgc ctgcacatta ccgcgtgaca 120

ggtgaccttg gtgatttae caccacttat ggctttattg gcgcgggtcg ccaactgaac 180

catgaaattt tcaaggacgg cgtaacgaa tgtggtgca gcatcgcagc actetaactt 240

ccgaatcatg caaffacca gcctcacagt aaccaagaca aatcgatct egcaccaccac 300

gatttctcg cctgggtact cggaaaaac actagtgttg ctgacttacg tgagcgcgtc 360

[0002]

aaagacgttc aattgattag tagcacggca gaattaatta acgaaafec accacttcac	420
tttatcatta gtagccaaac cggatgaacc gccgtcttgg aaccaactag tgccagactt	480
cgcttgatta ataaccagc cgccgtctctg accaattcac cgaacctcaa atggcageta	540
caaaacttaa gtaagtatgg caccctgact aacaccgagc ggccactaaa taaattcatt	600
aactaccaac ctggctcaca gggacctggt acgggcgcac taggtctacc tggtagctat	660
acttcgatgt ctcgcttgc accgaccgtc ttcttgaac actatgcga agtgccagcg	720
acaacaacag atacagtcaa ctacttcaa cacatctga atgctgtgac tattccaag	780
ggcgccaaag tagccgcca cggccaagca acctatactg agfacectag ctacatggac	840
ttgaatcacc aaacgtacc actagaactg tacgaaaac cgggagtgat tcagcaagtt	900
aacttaactg atcatttatt agaaaaacag accgtccctg tagaatacgc cctagtcgc	960
accccgaag tccaattact aactcccgat atgccaacct tgccagcgcc ccattaa	1017
<210>	2
<211>	987
<212>	DNA
<213>	基因 bsh3
<400>	2
atggtgacta gtttaacgat tcaaacacg ggggggac agtttttagc accaccatg	60

[0003]

gactttgctt tgaacttgg tggtegacca gttgcaatcc cacggaatea ccattttgac	120
agtgtacca atgceggacgg tttgatagc ccgtatagct ttgttgaac gggccgtgac	180
ttaaatgct atactttgt cgatggtgc aatgagcag gggtcagtgc tctgcacte	240
tatttcggt gacaagctca cttactcag cagactaagg ctggcaaggt taacttggca	300
ccccacgaag tttaaatgtg gattttagga aacgtgaaga gcaccgctga attaggcgaa	360
cggattgctg acttgaacgt gatggaagcc gccgcaccac tattgaatat tttggtacca	420
ctacactgga tcaatagta caagagtgt tctacttacg tcttagaatt ggaaaatgac	480
ggtgttcaact acatgaagaa tccggtgggc gtcattgaca acacaccaga ttttgaatgg	540
catctcaaga atttgagtaa ttactcaac ttacaaccg gccctcctcc tagtctcaa	600
tacggtgaca tgacggtgaa tctttcggc cctggaactg gggcgtcggg aatgcctggt	660
gactatacgt cagttgcacg ctctgtcgg acggtcttca tgcgtgaaca tacggatgca	720
gtaacgactg atgcagaagc tgicaacgca ttatcacaca tgctgaactc agtggagatt	780
cctaagggcg ttaagatgca agataacggg acgccagatt ataccagta ccgcgcctat	840
atgagcatgg atgaaccagc attttactg caaccatacg cggatcagac gattaccgcg	900
gtcgaattga caccagcttt aatgacggcc gcgcaaccga ctgaatttga attaaagaca	960

[0004]

acccaacagt tccggttagc aaactaa	987
<210> 3	
<211> 954	
<212> DNA	
<213> 基因 bsh4	
<400> 3	
atgtgtacca gcttaactta tcttgatact gacaatcacc gctacttgc cgcaccatg	60
gacttccaa caacgacacc ttggcggcca atfttttgc cgcgccgta tccgtggcca	120
actgggttag cgacgacgcg tatgacgcag tatgccattc tgggtgtgg tggctacct	180
gaccactta aggettgtt gatgctgac ggcattaacg aagctggtt ggtgtgtgt	240
gaactgtaet tgecccacgc cgttgaatac gccactcaac cacaagtcaa ccaaattaat	300
ttaacacctc aagcttcat caactgggt ttaggatgaac accaatcagt cgcagecgtg	360
atgccgafc tgccaagtgt taacctggtc ggtgcgtct ggggtgatga cactggtgaa	420
gtctatccct ttaactggtta cctcagtgat gcacacacca gtgtcgtcat cgaacccaet	480
ggtggcccac tgacggcgca accgaatcca gccggcgtec tgaccaatac accagtecta	540
agcgaccatc agcgcgact aaatctttat ttagcagtat ctggcaacca gattacaact	600

[0005]

gccactcgtc aggtctctca gcacgtgatt cagactaagc aaccattacc gagcgggccc 660  
 attcccactg atcgtttcat tcacatggca cticgaagac tgggaacacc gcagctagca 720  
 ccgcaacaag tggcgaccac ttattccgc tggttacaag aagtaagctt gccctaccac 780  
 gccgaccgtc accatctcat cagccacaac tacacgcact atcgttgitt gatcactgta 840  
 gccactcgtc ctaccgctt tattccagc acgactggc acgaacaac actgacacta 900  
 acacctgaaa tggcagcaac ctggcgaaca ccgtacctct tcctgccga tga 954

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> P1

<400> 4

cggtcggatc cgatgtgcac tagtetaac 29

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> P2

<400> 5

atactcgaga tgggccgctg gcaaggctg 28

[0006]

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> P3

<400> 6

cgtagatccg atgtgtacta gtttaacgat tc

32

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> P4

<400> 7

tgctctgagg ttgctaacc ggaactgttg g

31

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> P5

<400> 8

cttggatccg atgtgtacca gcttaactta tc

32

<210> 9

<211> 31

[0007]

<212> DNA

<213> P6

<400> 9

atactcgaga tggcagga agaggfacgg t

31

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> P7

<400> 10

tgagaccgt aitaigtgc

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> P8

<400> 11

tggttactg tgaggctg

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> P9

[0008]

<400> 12	
gaacggattg ctgacttg	18
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> P10	
<400> 13	
cgtattgaag actaggatg	19
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> P11	
<400> 14	
tccgctggct acaagaag	18
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> P12	
<400> 15	
caatcggcag gaaagagg	18

[0009]



<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> P13

<400> 16

aaggctgaaa ctcaaagg 18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> P14

<400> 17

aaccecaacat ctcacgac 18

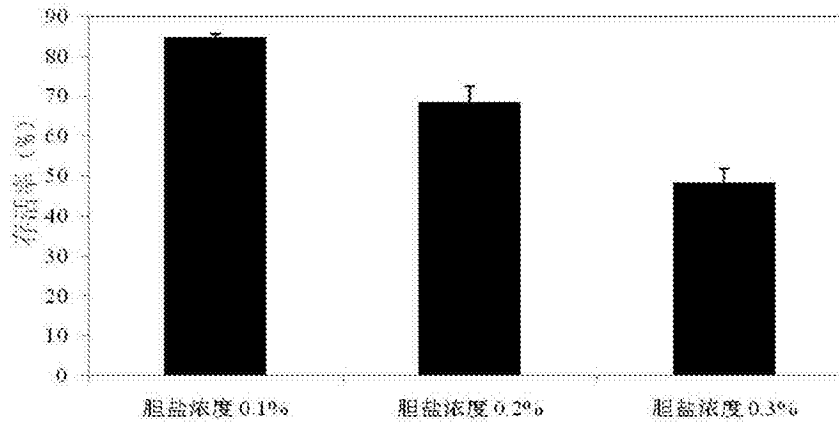


图 1

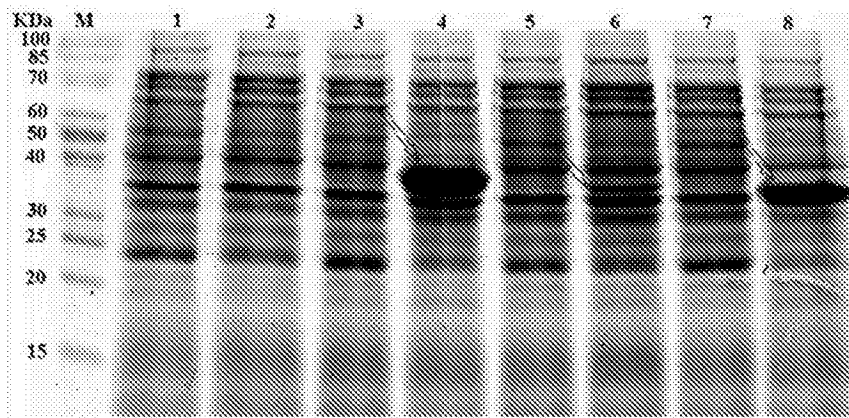


图 2

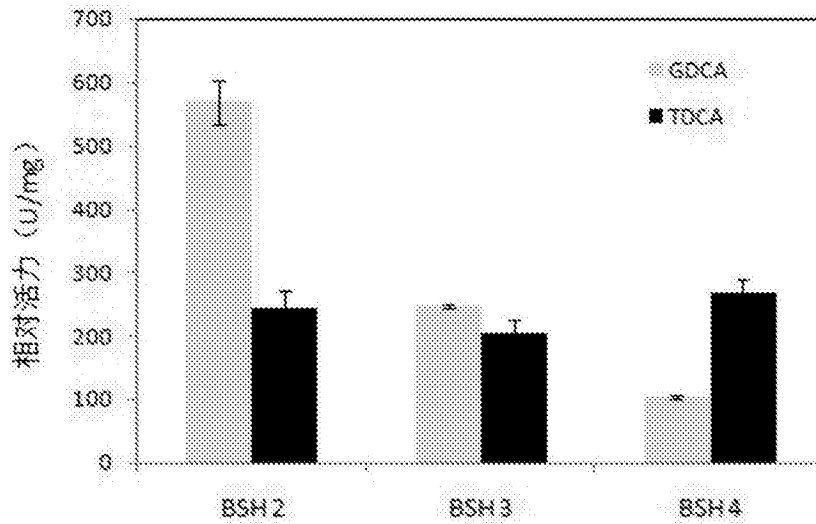


图 3

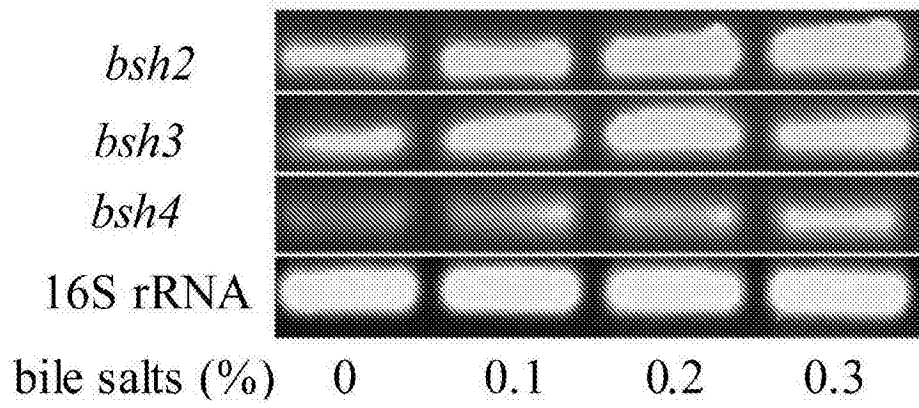


图 4