



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110923173 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911365498.0

(22)申请日 2019.12.26

(83)生物保藏信息

CGMCC 18661 2019.10.10

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

申请人 山东焦点生物科技股份有限公司

(72)发明人 史劲松 许正宏 龚劲松 刘伟

李会 钱建瑛 刘磊 李庆

张梦益 康传利

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 程斯佳

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 9/26(2006.01)

C12P 19/14(2006.01)

C12P 19/12(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

C12P 19/00(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种肠杆菌及其应用

(57)摘要

本发明属于化妆品生物技术领域,具体涉及一种降解透明质酸的肠杆菌及其培养方法和应用。本发明的肠杆菌(*Enterobacter* sp.)CGJ001于2019年10月10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,保藏编号为CGMCC NO.18661。该肠杆菌可以高效产生透明质酸酶,可用于高分子透明质酸制备低分子透明质酸以及寡聚透明质酸的工艺过程。该酶对透明质酸特异性高,热稳定性和pH稳定性良好,适合于规模化工业生产,从而替代传统的价格高昂的动物组织所提取到的透明质酸酶,在医药及化妆品等领域具有广阔的应用前景。



1. 一种肠杆菌 (*Enterobacter* sp.) CGJ001, 于2019年10月10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, 保藏地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所, 保藏编号为CGMCC NO.18661。

2. 根据权利要求1所述的一种肠杆菌, 其特征在于, 所述肠杆菌CGJ001具有降解透明质酸的作用。

3. 根据权利要求1所述的一种肠杆菌在生产透明质酸酶中的应用。

4. 根据权利要求3所述的一种肠杆菌的应用, 其特征在于, 所述肠杆菌CGJ001经平板培养、种子培养、发酵培养制得透明质酸酶。

5. 根据权利要求3所述的一种肠杆菌的应用, 其特征是, 所述应用具体包括以下步骤:

(1) 将肠杆菌CGJ001进行平板培养, 得平板菌种;

(2) 取平板菌种接种到已灭菌的种子培养基中, 在30~40℃、150~300rpm的条件下培养12~24h, 得种子液;

(3) 将种子液接种到已灭菌的发酵培养基中, 在30~40℃、150~300rpm的条件下培养12~24h, 得含透明质酸酶的菌液。

6. 根据权利要求5所述的一种肠杆菌的应用, 其特征在于, 所述种子培养基及发酵培养基组分包括1~10g/L透明质酸, 1~5g/LK₃PO₄, 0.1~1g/LMgSO₄, 1~10g/L蛋白胨, 1~10g/L酵母粉。

7. 根据权利要求3~6任一所述一种透明质酸酶的制备方法所制备的透明质酸酶, 其特征在于, 该酶对透明质酸的降解产物为2-6糖。

一种肠杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种降解透明质酸的肠杆菌及其培养方法和应用,属于化妆品生物技术领域。

[0002] 背景介绍

[0003] 透明质酸(hyaluronic acid,HA)是一种高分子酸性粘多糖。透明质酸是哺乳动物细胞外基质的主要成分,广泛存在于动物的组织细胞间质和某些细菌的荚膜中。由重复的 β -D-葡萄糖醛酸和N-乙酰-D-葡萄糖胺二糖单元组成,通过交替的 β -1,3糖苷键和 β -1,4糖苷键相连,构成的一种直链多糖。不同来源的透明质酸分子量差异很大,分子量范围极广。

[0004] 透明质酸在哺乳动物许多重要的生理和病理过程中发挥突出的作用。不同分子量的透明质酸对其生物学功能具有不同的重要意义。高分子量HA(HMW-HA)存在于健康组织中,充当具有免疫抑制特性的空间填充剂和润滑剂,低分子量HA(LMW-HA)在免疫激活中发挥相反的作用,作为内源性危险信号。HA经常用于药物和化妆品行业中,包括给药系统,日常化妆品等,并且是重要的生物相容性材料。然而,由于HA的免疫特性取决于其分子量,因此必须严格控制HA的分子量。特别是对于制药领域,严格控制透明质酸的分子量显得尤为重要。

[0005] 透明质酸酶能够降解透明质酸,通过破坏透明质酸 β -1,4糖苷键或 β -1,3糖苷键来实现降解作用。根据透明质酸酶的底物特异性、催化机理及其降解产物的类型将透明质酸酶分为三类。第一类透明质酸酶(EC 3.2.1.35)为牛睾丸型,通过作用于 β -1,4-糖苷键来降解透明质酸,主要产物为四糖,也可作用于硫酸软骨素和软骨素,水解产物也为相应的四糖。典型代表有牛睾丸透明质酸酶、蜜蜂毒液透明质酸酶和溶酶体透明质酸酶等。第二类透明质酸酶(EC 3.2.1.36)为水蛭型,通过作用于 β -1,3-糖苷键来降解透明质酸,其降解产物中含有四糖和己糖,不能作用于硫酸软骨素和软骨素。典型代表有水蛭透明质酸酶和钩虫唾液腺透明质酸酶等。第三类透明质酸酶(EC 4.2.2.1)为微生物型,广泛分布于细菌、病原真菌以及噬菌体中,通过作用于 β -1,4-糖苷键和 β 消除反应降解透明质酸生成不饱和二糖,也可作用于软骨素和硫酸软骨素。例如:梭状芽孢杆菌属、微球菌属、链球菌属和链霉菌属等。

[0006] 透明质酸酶被广泛应用于心内科、眼科、整形外科、肿瘤科、皮肤科以及妇科医学等。透明质酸酶通过降低心肌透明质酸含量,降低由于心肌缺血引起的动脉阻力,使血流量增加,可以有效减缓心肌梗塞。透明质酸酶与抗癌药物共同作用可使抗癌药物增效,在增强阿霉素抗乳腺癌以及降低膀胱癌复发率等方面发挥重要作用。透明质酸酶可以“破坏”肿瘤组织周围的透明质酸,对肿瘤生长有一定的抑制作用。利用透明质酸酶的辅助扩散作用将其作为药物分散剂可以水解粘多糖,促进治疗药物的吸收,也可以加速局部积聚液、渗出液等的扩散和吸收。此外,作为麻醉辅助剂,透明质酸酶可以有效促进麻醉药物的分散、吸收,缩短麻醉时间,增加麻醉深度。但是透明质酸酶应用过程中也发现了不少问题。因此,具有新属性的新型透明质酸酶将会成为未来的研究热点。目前已文献报道的透明质酸酶主要来源于链球菌,而至今为止有关肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)来源的透明质酸酶则从未见报

道。

发明内容

[0007] 针对目前透明质酸酶应用广泛、但资源短缺的问题,本发明提供一种肠杆菌(*Enterobacter* sp.)CGJ001,该菌种2019年10月10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,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号CGMCC NO.18661。

[0008] 上述肠杆菌CGJ001,革兰染色阴性,细菌呈短杆状。如图1~3所示。

[0009] 该肠杆菌(*Enterobacter* sp.)CGJ001菌株,经分子鉴定和测序,其16S rRNA的基因序列长度为1381bp,如SEQ NO.1所示。通过使用美国生物工程信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)BLAST程序比对,结果显示,结果显示该菌株的16S rDNA序列与*Enterobacter*属(JQ795804.1、KJ184972.1、MH883957.1等)的相关序列存在99.8%以上同源性,最终将其归为*Enterobacter*属菌株。

[0010] 在一种实施方式中,所述肠杆菌CGJ001具有降解透明质酸的作用。

[0011] 本发明的另一个目的在于,提供一种肠杆菌CGJ001在生产透明质酸酶中的应用。

[0012] 在一种实施方案中,所述肠杆菌CGJ001经平板培养、种子培养、发酵培养制得透明质酸酶。

[0013] 在一种实施方案中,所述应用具体包括以下步骤:

[0014] (1)将肠杆菌CGJ001进行平板培养,得平板菌种;

[0015] (2)取平板菌种接种到已灭菌的种子培养基中,在30~40℃、150~300rpm的条件下培养12~24h,得种子液;

[0016] (3)将种子液接种到已灭菌的发酵培养基中,在30~40℃、150~300rpm的条件下培养12~24h,得含透明质酸酶的菌液。

[0017] 在一种实施方案中,所述种子培养基及发酵培养基组分包括1~10g/L透明质酸,1~5g/L K_3PO_4 ,0.1~1g/L $MgSO_4$,1~10g/L蛋白胨,1~10g/L酵母粉。

[0018] 在一种实施方式中,所述种子培养基及发酵培养基pH值为6~8。

[0019] 在一种实施方式中,所述平板培养的培养基每升组分如下:

[0020] 蛋白胨1~10g、酵母粉1~10g、透明质酸钠1~10g、 $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 1~5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1~1g、水1000mL,琼脂粉15~25g,pH值为6~8。

[0021] 上述肠杆菌CGJ001菌液制备透明质酸粗酶液,步骤如下:

[0022] (i)取步骤(3)制得的肠杆菌CGJ001菌液离心获得菌体,所述离心的条件为:6000rpm离心10~15min;

[0023] (ii)弃去上述离心液上清,等体积加入PBS溶液重悬菌体;

[0024] (iii)将上述重悬菌体进行超声细胞破碎20min,制得透明质酸粗酶液。

[0025] 上述PBS溶液每升组分如下:

[0026] 磷酸二氢钠2~3g,无水磷酸氢二钠0.5~2g与氯化钠5~10g,水1000mL,调节pH5~7。

[0027] 采用盐酸、氢氧化钠调节上述PBS溶液的pH。

[0028] 上述超声破碎仪参数设置为:超声时间20min,破4S停6S,功率为300W。

[0029] 在一种实施方式中,上述任一种透明质酸酶的制备方法所制备的透明质酸酶,经质谱分析,该酶对透明质酸的降解产物为2-6糖。

[0030] 有益效果:

[0031] 本发明的肠杆菌CGJ001酶活力突出,对透明质酸特异性强,热稳定性和pH稳定性好,适合放大生产,从而替代价格高昂的动物组织提取到的透明质酸酶,在医药及化妆品等领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0032] 图1为肠杆菌CGJ001菌株在固体培养基上的菌落形态;

[0033] 图2为肠杆菌CGJ001菌株的光学显微镜照片;

[0034] 图3为肠杆菌CGJ001菌株的电镜图片;

[0035] 图4为透明质酸粗酶液降解对透明质酸钠粘度的影响;

[0036] 图5为透明质酸粗酶液的最适反应温度探究;

[0037] 图6为实施例5中透明质酸粗酶液的最适反应pH探究;

[0038] 图7为实施例5中粗酶液制备的不饱和寡糖的质谱分析图。

具体实施方式

[0039] 本发明将根据具体事例做进一步的描述,但其仅为例证性的目的而不起到限制性作用。本领域技术人员可由本说明书所解释的内容清楚的了解本发明的特点与功效,本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或运用。

[0040] 实施例1:

[0041] 取江苏无锡地区污染的河水水样,上清液1mL加入到9mL生理盐水中,分别稀释至浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的5个浓度梯度。将稀释后的菌悬液涂布于筛选培养基。

[0042] 每个浓度做两个平行,30℃培养5天。将生长良好的单菌落挑出,然后经过种子液体培养,涂布于固体培养基,再挑单菌落于种子液体培养基中,30℃、220转/分钟培养24h,取培养物0.9mL加入0.9mL40%的甘油,混匀后于-80℃冰箱长期保存。

[0043] 上述筛选培养基每升组分如下:

[0044] 透明质酸钠5g、 $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,水1000mL,另添加琼脂20g即为筛选培养基。

[0045] 上述种子培养基每升组分如下:

[0046] 蛋白胨5g、酵母粉5g、透明质酸钠5g、 $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、水1000mL,pH值为6。

[0047] 上述固体培养基每升组分如下:

[0048] 蛋白胨5g、酵母粉5g、透明质酸钠5g、 $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、水1000mL,pH值为6,另添加琼脂20g。

[0049] 肠杆菌CGJ001在生产透明质酸酶中的应用,步骤如下:

[0050] (1)取肠杆菌CGJ001进行平板培养,得平板菌种;

[0051] (2)将平板菌种接种到已灭菌的种子培养基中,在30℃、150rpm的条件下培养12h,得种子液;

[0052] (3) 将种子液接种到已灭菌的发酵培养基中,在30℃、150rpm的条件下培养12h,得含透明质酸酶的菌液。

[0053] 所述种子培养基及发酵培养基组分包括1g/L透明质酸,1g/L K_3PO_4 ,0.1g/L $MgSO_4$,1g/L蛋白胨,1g/L酵母粉。所述种子培养基及发酵培养基pH值为6。

[0054] 所述平板培养的培养基每升组分如下:

[0055] 蛋白胨5g、酵母粉5g、透明质酸钠5g、 $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、水1000mL,琼脂粉20g,pH值为6。

[0056] 上述肠杆菌CGJ001菌液制备透明质酸粗酶液,步骤如下:

[0057] (i) 取步骤(3)制得的含透明质酸酶的菌液离心获得菌体,所述离心的条件为:6000rpm离心10min;

[0058] (ii) 弃去上述离心液上清,等体积加入PBS溶液重悬菌体;

[0059] (iii) 将上述重悬菌体进行超声细胞破碎20min,制得透明质酸粗酶液。

[0060] 上述PBS溶液每升组分如下:

[0061] 磷酸二氢钠2.5g,无水磷酸氢二钠1.0g与氯化钠8.2g,水1000mL,调节pH至6.2。

[0062] 采用盐酸、氢氧化钠调节上述PBS溶液的pH。

[0063] 上述超声破碎仪参数设置为:超声时间20min,破4S停6S,功率为300W。

[0064] 实施例2:

[0065] 测透明质酸粗酶液的酶活具体方法如下:

[0066] 配制DNS溶液:

[0067] 称取3,5-二硝基水杨酸(10 ± 0.1)g,置于约600mL水中,逐渐加入氢氧化钠10g,在50℃水浴中(磁力)搅拌溶解,再依次加入酒石酸钾钠200g、苯酚2g和无水亚硫酸钠5g,待全部溶解并澄清后,冷却至室温,用水定容至1000mL,过滤。贮存于棕色试剂瓶中,于暗处放置7d后使用。(轻工业部标准DNS试剂的配制)

[0068] 反应体系共3mL,2mLDNS溶液中分别加入0,50,100,150,200 μ L的葡萄糖标准液(2mg/mL),加水补足到3mL,沸水浴煮沸10min,冷却至室温,加水补足到10mL,在540nm下测定吸光度,以吸光度为横坐标,以葡萄糖质量浓度为纵坐标制作标准曲线。

[0069] 透明质酸粗酶液样品的测定步骤如下:

[0070] 需要配置如下试剂:2mg/mL透明质酸,50mmol/L、pH 6.0PBS缓冲液。反应体系1mL,800 μ L透明质酸,100 μ L的透明质酸粗酶液,PBS缓冲液补足1mL,39℃水浴锅中反应15min,用1mL反应的样品代替葡萄糖标准液,测定吸光值代入标准曲线求得还原当量的葡萄糖质量浓度。

[0071] 一个单位酶活(Unit)定义为:在上述实验条件下,每1h产生1 μ g葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

[0072] 本发明的肠杆菌CGJ001,发酵酶活达到8139U/mL。

[0073] 实施例3:

[0074] 如图1所示,对肠杆菌CGJ001的固体培养基平板、光学显微镜和电镜形态进行了观察与鉴定,结果显示该菌株在透明质酸固体培养基平板上的菌落呈凸起的菌落,表面光滑湿润、晶莹,颜色为乳白色,易挑取。在光学显微镜下观察,细胞呈短杆状。该菌株为短粗的革兰阴性杆状细菌,无荚膜,无芽孢,无鞭毛,可以透明质酸为唯一碳源生长。

[0075] 上述用于菌株基因扩增的通用引物为：

[0076] 正向引物为27f:5'-AGTTTGATCCTG GCT CAG-3'；

[0077] 反向引物为1492r:5'-GCTTACCTTGTTACGACTT-3'。

[0078] 上述用于菌株基因扩增的反应体系如下,总体积20 μ L

浓度 10mmol/L 的正向引物 27f 1 μ L

浓度 10mmol/L 的反向引物 1492r 1 μ L

[0079] 2xES-taq 酶 10 μ L

超纯水 8 μ L

[0080] 并挑取上述固体培养基上单菌落混匀于该体系。

[0081] 所用基因扩增试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0082] 上述用于菌株基因扩增的程序为95 $^{\circ}$ C预变性10min,95 $^{\circ}$ C变性30S,55 $^{\circ}$ C退火30S,72 $^{\circ}$ C延伸90S,共34个循环,72 $^{\circ}$ C延伸15min,4 $^{\circ}$ C保温。

[0083] 该菌株的16S rDNA序列长度为1381bp,在NCBI数据库中进行序列Blast比对,最终结果显示该菌株的16S rDNA序列与Enterobacter属(JQ795804.1、KJ184972.1、MH883957.1等)的相关序列存在99.8%以上同源性,最终将其归为Enterobacter属菌株。结合形态特征和生理生化特性,将其鉴定为肠杆菌(Enterobacter sp.)CGJ001,该菌株已保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为CGMCC No.18661。

[0084] 实施例4:

[0085] 按照5%的加酶量往50ml 10g/mL的透明质酸钠溶液中加入实施例1所制备的透明质酸粗酶液,放入39 $^{\circ}$ C的恒温水浴锅中反应,体系初始粘度为1405cP。每隔10min测量一次体系粘度并取样1mL,煮沸2min灭活,然后采用DNS法测量其不同时间段的吸光度。

[0086] 结果如图4所示,随着酶解时间的增加,透明质酸钠溶液的粘度下降,整个体系的DNS反应的吸光度增加。该结果表明,随着酶解作用的时间增加,透明质酸钠的粘度下降,产生的具有还原性末端的寡糖数量增加。

[0087] 利用肠杆菌CGJ001制备的粗酶液制剂对不同多糖降解能力的分析

[0088] 将浓度2mg/mL的多糖底物、PBS缓冲液以及实施例1所制备的透明质酸粗酶液按8:1:1(体积比)的比例混合后,在39 $^{\circ}$ C、下反应4h,沸水浴中温育5min使酶失活,8000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min,取上清,作为利用肠杆菌CGJ001制备的粗酶液制剂的酶解产物,用DNS法检测生成的还原糖。

[0089] 结果如表1所示,利用肠杆菌CGJ001制备的透明质酸粗酶液制剂对透明质酸特异性高,对海藻酸钠和壳聚糖均无降解能力,具有潜在的应用价值。

[0090] 表1:利用肠杆菌CGJ001制备的粗酶液制剂对不同多糖降解能力

多糖种类	透明质酸钠	壳寡糖	海藻酸钠
降解能力	+	-	-

[0092] 注:“+”代表能够降解,“-”代表不能降解。

[0093] 在阴离子模式下进行的质谱分析结果表明,用实施例1所制备的透明质酸粗酶液降解透明质酸所得寡糖产物为:分子量为379的透明质酸二糖,分子量为758的透明质酸四

糖,分子量为1137的透明质酸六糖,如图7所示。

[0094] 实施例5:

[0095] 将浓度2mg/mL的透明质酸、PBS缓冲液以及实施例1所制备的透明质酸粗酶液按8:1:1(体积比)的比例混合后,做三个平行,分别放入35、37、39、41、43℃的水浴锅中反应1h,取出放入100℃水浴锅中5min灭活。加入2ml DNS试剂,放入100℃水浴锅中反应10min。取出放置至室温。紫外分光光度计540nm下测定吸光度。

[0096] 相对酶活定义为:各组平均吸收值与最大吸收值的百分比。最大吸收值对应的为粗酶液的最适反应温度。

[0097] 透明质酸粗酶液的最适反应温度结果如图5所示,透明质酸粗酶液的最适反应温度为39℃。

[0098] 透明质酸粗酶液的最适反应pH探究

[0099] 分别用pH为4、5、6、7、8的磷酸盐缓冲液配制浓度为2mg/mL的透明质酸溶液,待透明质酸完全溶解后,置于最适温度39℃中孵育,然后向每900μL不同pH的透明质酸溶液中加入100μL实施例1所制备的透明质酸粗酶液,混匀后开始反应,39℃水浴锅中反应1h,每个条件下设置3个平行样品。反应结束,取出放入100℃水浴锅中5min灭活。加入2ml DNS试剂,放入100℃水浴锅中反应10min。取出放置至室温。紫外分光光度计540nm下测定吸光度。

[0100] 相对酶活定义为:各组平均吸收值与最大吸收值的百分比。最大吸收值对应的为粗酶液的最适pH。

[0101] 透明质酸粗酶液的最适反应pH结果如图6所示,透明质酸粗酶液的最适反应pH为6-7。

[0102] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

序列表

<110>	江南大学 山东焦点生物科技股份有限公司	
<120>	一种肠杆菌及其应用	
<160>	1	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	1381	
<212>	DNA	
<213>	肠杆菌 (Enterobacter sp.)	
<400>	1	
	gtagcgcct cccgaagggt aagctaccta cttcttttgc aaccactcc catggtgtga	60
	cgggcggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgtag cattctgac tacgattact	120
	agcgattccg acttcatgga gtcgagttgc agactccaat cggactacg acgcacttta	180
	tgaggtcgc ttgctctcgc gaggtcgtt ctctttgtat gcgccattgt agcacgtgtg	240
	tagccctact cgtaagggcc atgatgactt gacgtcatcc ccaccttct ccagtttatc	300
	actggcagtc tcctttgagt tcccggcctg accgctggca acaaaggata agggttgcgc	360
	tcgttgccgg acttaacca acatttaca acacgagctg acgacagcca tgcagcacct	420
	gtctcagagt tcccgaaggc accaatccat ctctggaaag ttctctggat gtcaagagta	480
	ggtaaggttc ttcgcgttgc atcgaattaa accacatget ccaccgcttg tgcgggcccc	540
	cgtaattca tttgagtttt aaccttgcgg ccgtactccc caggcggtcg acttaacgcg	600
	ttagctccgg aagccacgcc tcaaggcac aacctccaag tcgacatcgt ttacggcgtg	660
	gactaccagg gtatctaate ctgtttgctc cccacgttt cgcacctgag cgctcagtctt	720
	tgtccagggg gccgccttcg ccaccggtat tctccagat ctctacgat ttcaccgcta	780
	cacctggaat tctaccccc tctacaagac tctagcctgc cagtttcgaa tgcagttccc	840
	aggttgagcc cggggatttc acatccgact tgacagaccg cctgcgtgcg ctttacgccc	900
	agtaattccg attaacgctt gcacctccg tattaccgcg gctgctggca cggagttagc	960
	cggtgcttct tctgcgggta acgtcaatcg acaaggttat taaccttatc gccttctctc	1020
	ccgctgaaaag tactttacaa cccgaaggcc ttcttctaac acgcgcatg gctgcatcag	1080
	gcttgccccc attgtgcaat attccccact gctgctccc gtaggagtct ggaccgtgtc	1140
	tcagttccag tgtggctggt cactctctca gaccagctag ggatcgtcgc ctaggtgagc	1200
	cgttaccca cctactaget aatcccatct gggacatct gatggcaaga ggcccgaagg	1260
	tccccctctt tggctcttgc acgttatgag gtattagcta ccgtttccag tagttatccc	1320
	cctccatcag gcagtttccc agacattaact caccgctccg ccgctcgtca cccaagagca	1380
	a	1381

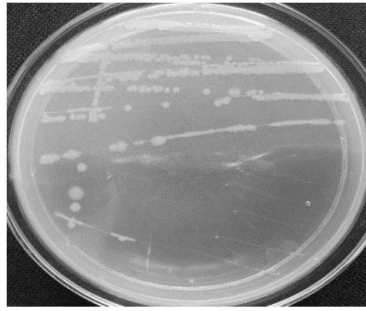


图1

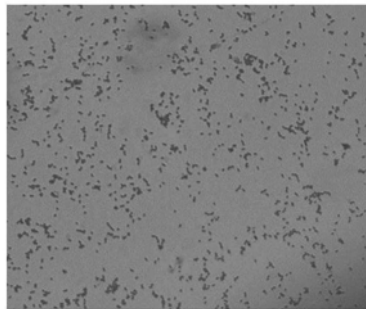


图2



图3

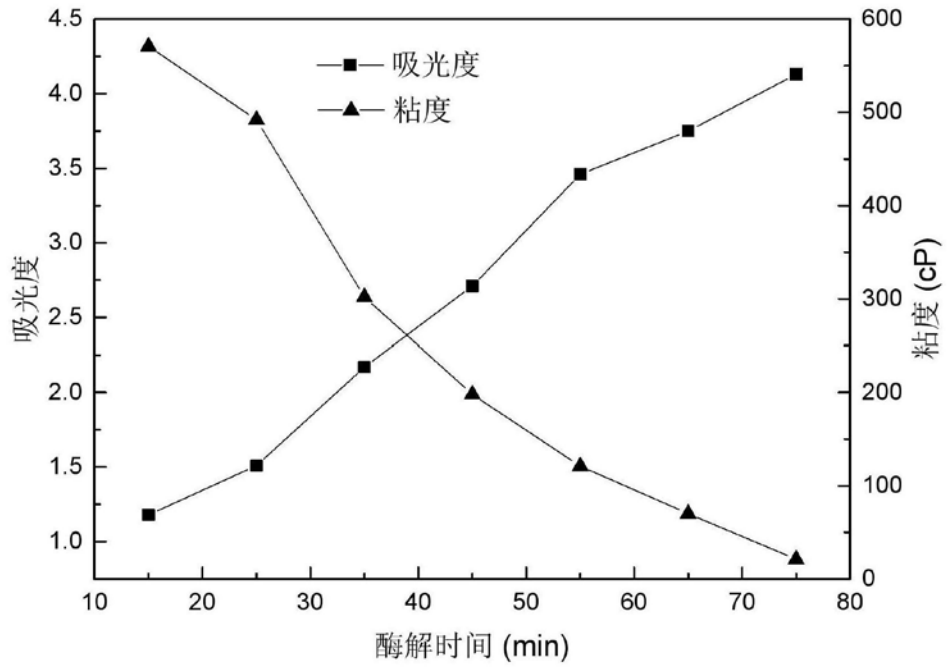


图4

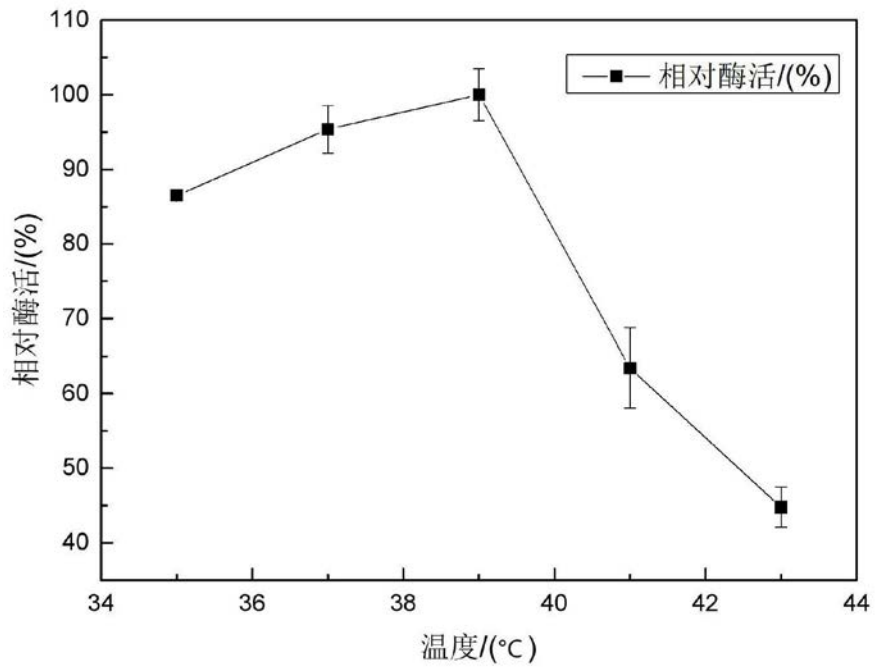


图5

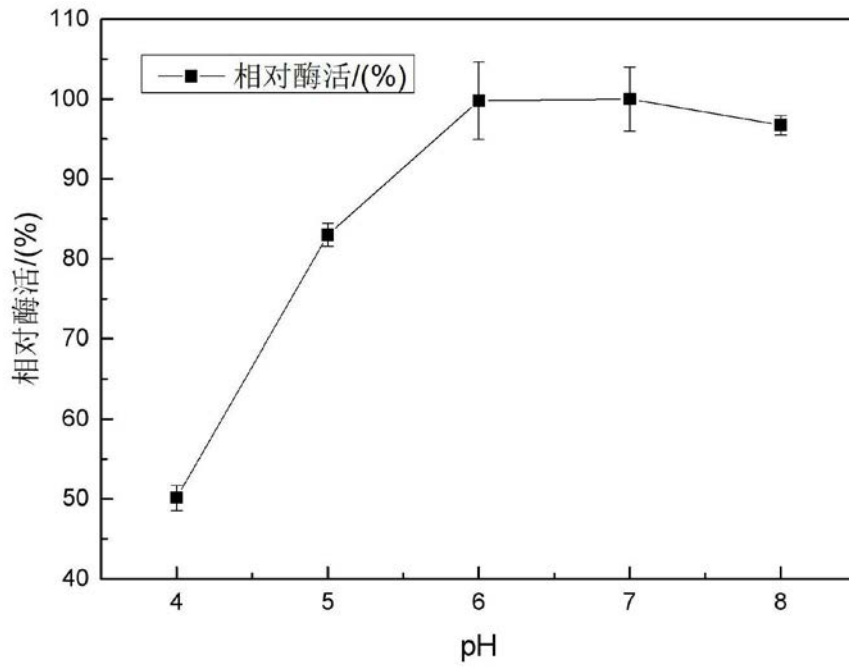


图6

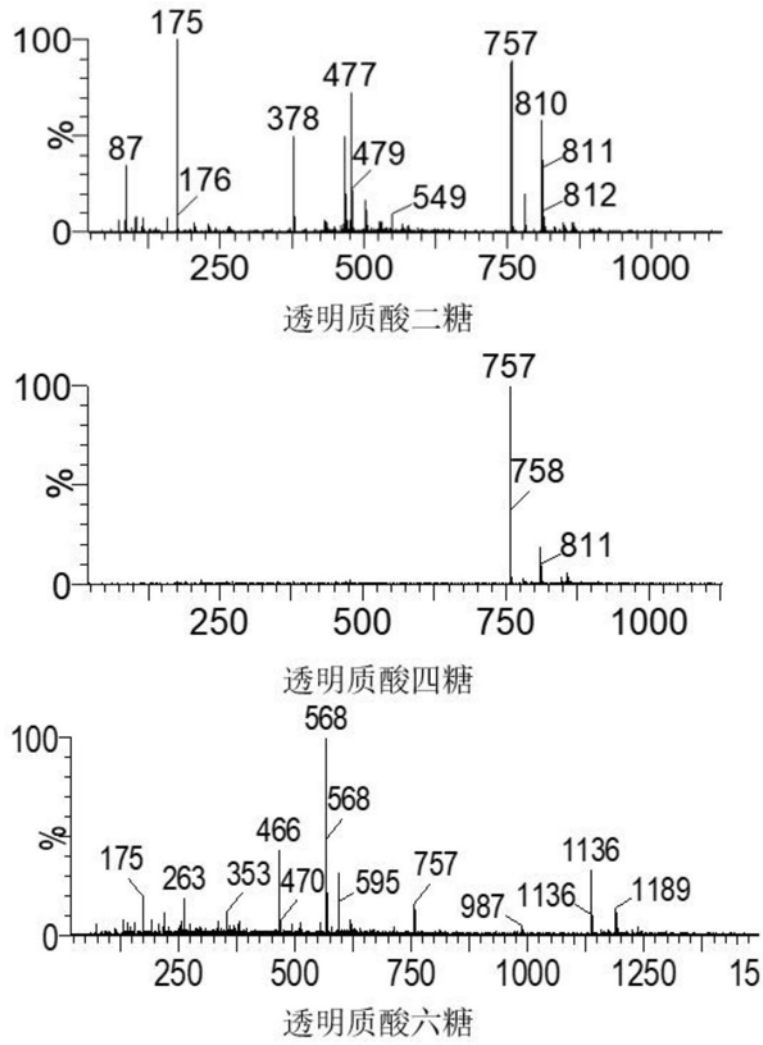


图7