



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101993887 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

(21) 申请号 201010252742.5

C12N 15/66(2006.01)

(22) 申请日 2010.08.13

C12R 1/19(2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC M 2010199 2010.08.11

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
江南大学生物工程学院

(72) 发明人 沈微 王正祥

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C12N 15/75(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

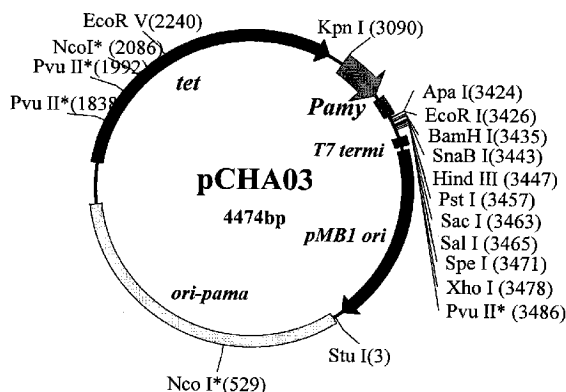
权利要求书 1 页 说明书 5 页 序列表 4 页
附图 1 页

(54) 发明名称

一种芽孢杆菌高效分泌表达载体及其构建方法

(57) 摘要

一种芽孢杆菌高效分泌表达载体及其构建方法，属于微生物、基因工程技术领域。芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03，其核苷酸序列为 SEQ ID NO：2，该芽孢杆菌分泌型表达载体的大肠杆菌转化子 JM109/pCHA03 已保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏编号 CCTCC M 2010199。本发明主要利用我国中温 α-淀粉酶生产菌株 (B.myoliquefaciens) CICIM B4311 α-淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区构建适合在芽孢杆菌中分泌表达外源蛋白的载体 pCHA03。本发明实施后获得的分泌表达载体可以实现多种外源蛋白在芽孢杆菌宿主中的高效分泌表达，在酶制剂生产、多肽类药物生产等领域具有应用前景。



1. 一种芽孢杆菌分泌表达载体,分类命名为 pCHA03,其核苷酸序列为 SEQID NO:2,该芽孢杆菌分泌型表达载体的大肠杆菌转化子 JM109/pCHA03 已保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号 CCTCC M 2010199。

2. 权利要求 1 所述表达载体 pCHA03 的构建方法,其特征在于:

(1) 制备中温 α -淀粉酶表达控制元件 Pamy:以生产菌 CICIM B4311 中温 α -淀粉酶基因启动子和信号肽编码区组成表达调控元件 Pamy,利用 PCR 方法获得生产菌 CICIM B4311 中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区的基因片段,其核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1,与文献报道的解淀粉芽孢杆菌标准株 α -淀粉酶基因核苷酸序列相比,序列 SEQ ID NO:1 在基因的启动子区有 1 个碱基序列发生变化,位于 -49 位的碱基发生改变 C 转变为 T;

(2) 构建大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02:它含有芽孢杆菌复制元件 ori-pama,大肠杆菌复制元件 pMB1 ori 和能在芽孢杆菌和大肠杆菌中使用的四环素抗性基因 tet;

该大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 的构建步骤如下:

第一步:以大肠杆菌质粒 pBR322 为模板,用 PCR 方法获得大肠杆菌复制原件 pMB1 ori;

第二步:以大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300PLK 为模板,利用 PCR 方法获得该质粒中芽孢杆菌复制元件 ori-pama 和四环素抗性基因 tet;

将上述两步获得的 DNA 片段进行连接,获得大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02;

(3) 步骤 (1) 中获得的中温 α -淀粉酶表达控制元件 Pamy 与步骤 (2) 中获得的大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 进行重组,获得芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03。

3. 权利要求 1 所述的芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 的应用,其特征在于:芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 用于转化不同类型的芽孢杆菌:枯草芽孢杆菌,解淀粉芽孢杆菌,及地衣芽孢杆菌,利用中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区控制外源蛋白的表达。

一种芽孢杆菌高效分泌表达载体及其构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及采用基因工程手段构建芽孢杆菌高效分泌表达载体,属于微生物、基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 芽孢杆菌是一类格兰仕阳性细菌,其很多菌株如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等被用作淀粉酶、蛋白酶等酶制剂的生产,许多产品如中温 α -淀粉酶、1398 蛋白酶等被长期用于食品加工。芽孢杆菌还具有严格好氧生长的特点,因此一般不具有致病性,是一类比较安全的微生物。除具有较高的安全性外,芽孢杆菌还具有向细胞外大量分泌蛋白质的能力,因此也是一类表达外源蛋白的理想宿主菌。

[0003] 中温 α -淀粉酶的工业生产菌株主要为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*),目前我国酶制剂工业所采用的生产菌株是 60 年代中温 α -淀粉酶生产菌株 BF7658 基础上获得的,为我国酶制剂工业所特有,这一菌株是在野生型解淀粉芽孢杆菌基础上经反复物理化学诱变产生的淀粉酶高产菌株 [无锡酶制剂厂. 枯草杆菌 BF-7658 α -淀粉酶高产菌株 209 的选育和投产. 遗传学报,1976,9(3): 216-223.]。在这一淀粉酶高产菌株中,其控制淀粉酶表达的启动子是用于构建芽孢杆菌表达载体的理想材料。本发明所使用的中温 α -淀粉酶生产菌株由江南大学中国高校工业微生物资源与信息中心 (<http://www.cicim-cu.jiangnan.edu.cn>) 提供,其收藏编号为 *B. amyloliquefaciens* CICIM B4311。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是:通过基因重组的方法,利用中温 α -淀粉酶生产菌株细胞内 α -淀粉酶基因的强启动子和信号肽编码区构建一种能控制外源蛋白在芽孢杆菌宿主中高效分泌表达的载体,为酶制剂、多肽类药物等蛋白质的生产提供一种高效分泌表达载体。

[0005] 本发明的技术方案:一种芽孢杆菌分泌表达载体,分类命名为 pCHA03,其核苷酸序列为 SEQ ID NO:2,该芽孢杆菌分泌型表达载体的大肠杆菌转化子 JM109/pCHA03 已保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号 CCTCC M2010199。

[0006] 所述表达载体 pCHA03 的构建方法:

[0007] (1) 制备中温 α -淀粉酶表达控制元件 Pamy:以生产菌 CICIM B4311 中温 α -淀粉酶基因启动子和信号肽编码区组成表达调控元件 Pamy,利用 PCR 方法获得生产菌 CICIM B4311 中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区的基因片段,其核苷酸序列为 SEQ ID NO.1,与文献报道的解淀粉芽孢杆菌标准株 α -淀粉酶基因核苷酸序列 [Palva I. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*(J). *Gene*,1982,19(1):81-87.] 相比,序列 SEQ ID NO:1 在基因的启动子区有 1 个碱基序列发生变化,位于 -49 位的碱基发生改变 C 转变为 T;

[0008] (2) 构建大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02: 它含有芽孢杆菌复制元件 ori-pama, 大肠杆菌复制元件 pMB1 ori 和能在芽孢杆菌和大肠杆菌中使用的四环素抗性基因 tet;

[0009] 该大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 的构建步骤如下:

[0010] 第一步: 以大肠杆菌质粒 pBR322 为模板, 用 PCR 方法获得大肠杆菌复制原件 pMB1 ori;

[0011] 第二步: 以大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300PLK[Ishiwa H and Shibahara-Sone H. New shuttle vectors for Escherichia coli and Bacillus subtilis. IV. The nucleotide sequence of pHY300PLK and some properties in relation to transformation(J). Jpn J Genet, 61:515-528(1986).] 为模板, 利用 PCR 方法获得该质粒中芽孢杆菌复制元件 ori-pama 和四环素抗性基因 tet;

[0012] 将上述两步获得的 DNA 片段进行连接, 获得大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02;

[0013] (3) 步骤 (1) 中获得的中温 α -淀粉酶表达控制元件 Pamy 与步骤 (2) 中获得的大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 进行重组, 获得芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03。

[0014] 所述的芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 的应用, 芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 用于转化不同类型的芽孢杆菌: 枯草芽孢杆菌, 解淀粉芽孢杆菌, 及地衣芽孢杆菌, 利用中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区控制外源蛋白的表达。

[0015] 材料和方法

[0016] 普通分子生物学方法:

[0017] 除非提及, DNA 操作和转化按照标准的分子生物学方法进行 (Sambrook 等 1989 分子克隆实验手册), 芽孢杆菌的转化按照芽孢杆菌分子生物学操作的经典方法进行 (Harwood, C. R. 和 Cutting, S. M. (eds) 芽孢杆菌的分子生物学方法)。

[0018] 除非另外提及, PCR 操作使用标准方法和 PCR 反应数据进行, 可参见 (Sambrook 等 1989 分子克隆实验手册)。

[0019] DNA 操作所使用的酶根据供应商的说明等使用。

[0020] 引物均为本专利发明人设计并由上海生工生物工程有限公司合成。

[0021] 大肠杆菌 JM109, 枯草芽孢杆菌标准株 168, 地衣芽孢杆菌标准株 14580 均由中国高校工业微生物资源与信息中心 (<http://www.cicim-cu.jiangnan.edu.cn>) 提供。

[0022] DNA 操作使用的酶

[0023] 除非另外提及, 所有的酶, 例如限制性内切酶, 连接酶等均来自上海生工生物工程有限公司。

[0024] 培养基

[0025] LB 在“Sambrook 等 1989 分子克隆实验手册”中描述。发酵培养基: 豆饼粉 32g/L, 鱼粉 11g/L, 淀粉 10g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g/L, 用自来水配制。液体摇瓶培养均采用 500mL 三角瓶, 在 37°C 条件下按 220r/min 条件在恒温摇瓶柜中进行。

[0026] α -淀粉酶活力测定

[0027] 参考中国轻工业部标准 GB1805. 1-93

[0028] 生物材料样品保藏: 芽孢杆菌分泌型表达载体的大肠杆菌转化子 JM109/pCHA03, 已保藏在中国典型培养物保藏中心, 简称 CCTCC, 保藏日期 2010 年 8 月 11 日, 保藏编号

CCTCC M 2010199。

[0029] 本发明的有益效果：本发明实施后获得的分泌表达载体可以实现多种蛋白在芽孢杆菌宿主中的高效分泌表达，在酶制剂生产、多肽类药物生产等领域具有应用前景。

附图说明

[0030] 图 1 大肠杆菌 - 芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 的限制性酶切图谱结构。

[0031] 图中符号意义如下：T7 termi：来源于 T7 噬菌体的转录终止子；pMB1 ori：来源于大肠杆菌质粒 pBR322 的大肠杆菌复制原件；ori-pama：来源于芽孢杆菌载体 pHY300PLK 的芽孢杆菌复制元件；tet：四环素抗性基因，可以使含有质粒的大肠杆菌和芽孢杆菌转化子表现出四环素抗性。

[0032] 图 2 芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 的限制性酶切图谱。

[0033] 图中符号意义如下：Pamy：中温 α -淀粉酶表达控制元件，包括中温 α -淀粉酶基因强启动子和信号肽编码区；T7 termi：来源于 T7 噬菌体的转录终止子；pMB1 ori：来源于大肠杆菌质粒 pBR322 的大肠杆菌复制原件；ori-pama：来源于芽孢杆菌载体 pHY300PLK 的芽孢杆菌复制元件；tet：四环素抗性基因，可以使含有质粒的大肠杆菌和芽孢杆菌转化子表现出四环素抗性。

具体实施方式

[0034] 通过实施例对本发明作进一步说明，实施例将不以任何方式限制本发明的范围。

[0035] 实施例 1：中温 α -淀粉酶基因表达调控元件 Pamy 的克隆

[0036] 以解淀粉芽孢杆菌 CICIM B4311 染色体 DNA 为模板扩增 α -淀粉酶基因的表达控制元件 (Pamy)，采用引物：

[0037] 5' -AATTACCGGTACCCTGGCTGAAAACATTGAGCC-3'，(SEQ ID NO:3)

[0038] 5' -AATCCGCGGCTCGAGAAGTAGTGTGACGAGCTCCTGCAGAAGCTTTACGTAGGATCCAATGAATTCGAATTCGGGCCATTTACGGCTGATG-3'，(SEQ ID NO:4)

[0039] 扩增片段全长约 0.3kb，用限制性内切酶 Kpn I、和 Sac II 消化，与经相同酶切的分子克隆通用载体 pBluescript sk(-) 连接，连接混合物转化大肠杆菌 JM109 的感受态细胞，37°C 下在含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 平板上选择转化子。转化子质粒命名为 pSK-amy，该质粒含有中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区，为便于使用在信号肽编码区下游增加了多个限制性内切酶识别位点。

[0040] 实施例 2：大肠杆菌 - 芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 的构建

[0041] 第一步：获得含大肠杆菌复制元件 pMB1 ori 的 DNA 片段

[0042] 以质粒 pBR322 为模板，用 PCR 方法扩增大肠杆菌复制元件，利用引物如下：

[0043] 5' -ATCTCGAGCAGCTGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAATCATGACCAAAATCCCTTAAC-3'，(SEQ ID NO:5)

[0044] 5' -ATAGGCCTTACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACC GCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCC-3'，(SEQ ID NO:6)

[0045] PCR 扩增获得一约 0.9kb 大小的 DNA 片段，该片段包含大肠杆菌复制原件 pMB1

ori, 该片段用 Xho I 和 Stu I 酶切后备用。在引物 SEQ ID NO :5 中, 下划线部分序列与 T7 噬菌体转录终止序列一致, 在所构建的载体中起转录终止的作用。

[0046] 第二步获得含芽孢杆菌复制元件 ori-pama 和四环素抗性基因 tet 的片段

[0047] 以芽孢杆菌质粒 pHY300PLK 为模板, 扩增含芽孢杆菌复制元件 ori-pama 和四环素抗性基因 tet 的片段, 利用引物如下:

[0048] 5' -ATAGGCCTGCTAGAAATTCCTTAAGG-3', (SEQ ID NO :7)

[0049] 5' -ATCTCGAGAATGCATGGTACCGCTAGAAATTCCTGTTATAAAAAAAGGATC-3', (SEQ ID NO :8)

[0050] PCR 扩增获得一约 3kb 大小的 DNA 片段, 该片段含有芽孢杆菌复制元件 ori-pama 和四环素抗性基因 tet, 片段用 Xho I 和 Stu I 酶切后与在本实施例第一步中获得的片段进行连接, 连接物转化大肠杆菌 JM109, 在含四环素的 LB 平板上筛选转化子, 转化子质粒命名为 pCH02, 该质粒的限制性酶切图谱如图 1 所示。

[0051] 实施例 3: 芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 的构建

[0052] 将实施例 1 中获得的重组质粒 pSK-amy 用限制性内切酶 Kpn I 和 Sac II 酶切, 分离其中约 0.3kb 大小的片段, 该片段含有中温 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽编码区组成的表达调控元件 Pamy, 分离后备用。

[0053] 将实施例 2 中获得的大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pCH02 用限制性内切酶 Kpn I 和 Xho I 酶切, 与上一步骤中用同样酶切并分离获得的 0.3kb 片段进行连接, 连接物转化大肠杆菌 JM109, 在含四环素的 LB 平板上筛选转化子, 转化子质粒命名为 pCHA03, 该质粒的限制性酶切图谱结构如图 2 所示。

[0054] 实施例 4: 利用芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03 实现嗜热 α -淀粉酶基因在芽孢杆菌中的分泌表达

[0055] 以含有古细菌 *Pyrococcus furiosus* 来源的嗜热 α -淀粉酶基因的质粒 pEtac-amy [沈微王正祥唐雪明等. 古细菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的分泌表达. 中国酿造, 2003, 1:12-14.] 为模板, 利用引物如下:

[0056] 5' -AATGAATTCATGGCAAATACTTGGAGC-3', (SEQ ID NO :9)

[0057] 5' -AATAAGCTTTTACCCAACACCACAATAAC-3', (SEQ ID NO :10)

[0058] PCR 扩增获得一约 1.4kb 大小的 DNA 片段, 该 DNA 片段为 *P. furiosus* α -淀粉酶基因的成熟肽编码基因 (pfa), 编码的 α -淀粉酶具有极高的耐热性, 在 121°C 条件下处理 1 小时酶活仍能保留一半以上^[4]。上述 DNA 片段用 EcoR I 和 Hind III 酶切后与实施例 3 中获得的经同样酶切处理的载体 pCHA03 进行连接, 连接物转化大肠杆菌 JM109, 在含四环素的 LB 平板上筛选转化子, 转化子质粒命名为 pCHA-pfa。大量提取质粒 pCHA-pfa 分别转化枯草芽孢杆菌标准株 168、解淀粉芽孢杆菌 CICIM B2125 和地衣芽孢杆菌标准株 14580 等, 在含 15 μ g/mL 四环素的 LB 固体培养基中筛选转化子, 转化子分离纯化后分别接种含 15 μ g/mL 四环素的 LB 液体培养基, 培养 24 小时后分别取 10mL 培养液接种 100mL 发酵培养基中。作为对照, 用空质粒 pCHA03 转化枯草芽孢杆菌标准株 168、解淀粉芽孢杆菌 CICIM B2125 和地衣芽孢杆菌标准株 14580 等获得的转化子也同样接种。上述菌株在发酵培养基中摇瓶培养 48 小时后各取培养液 30mL, 以 8,000r/min 离心 20min, 取上清液在高压灭菌锅中 121°C 保温 1 小时, 保温后分别取少量培养液检测酶活, 结果如表 1

[0059] 表 1 不同转化子培养液的酶活

[0060]

宿主菌	转化子所含质粒	酶活
枯草芽孢杆菌	pCHA03	0
枯草芽孢杆菌	pCHA-pfa	8.3
地衣芽孢杆菌	pCHA03	0
地衣芽孢杆菌	pCHA-pfa	16.1
解淀粉芽孢杆菌	pCHA03	0
解淀粉芽孢杆菌	pCHA-pfa	32.5

[0061] 由表 1 可见, 含有空质粒 pCHA03 的转化子发酵液高温处理后均不能检测出酶活。虽然上述三种芽孢杆菌自身均能产生一定量的 α -淀粉酶, 但其自身所产生的 α -淀粉酶在 121℃ 保温 1 小时后均已失活。含重组质粒 pCHA-pfa 的转化子的发酵液在高温处理后均能检测到明显的 α -淀粉酶活力, 显然这是 *P. furiosus* α -淀粉酶基因表达的结果, 由于本实施例中使用的 *P. furiosus* α -淀粉酶基因只有成熟肽编码区, 不含信号肽, 因此该基因是在 pCHA03 的中温 α -淀粉酶基因启动子的控制下表达并且在中温 α -淀粉酶信号肽的引导下分泌到细胞外的。由本实施例可见, 利用 pCHA03 质粒可以成功实现外源基因在枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌等多种芽孢杆菌中的分泌表达。

[0001]

序 列 表

<160> 10

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 328

<212> DNA

<213> 解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* CICIM B2125

<400>1

```

ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 60
tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc atcagacagg gtatttttta 120
tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaat aaggaataaa ggggggttgt tattatttta 180
ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg agaggaaaca tgattcaaaa 240
acgaaagcgg acagtctcgt tcagacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 300
gccgattaca aaaacatcag ccgtaaat 328

```

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 4474

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌分泌表达载体 pCHA03

<400>2

```

aggcctgcta gaaattcctt aaggaacgta cagacggctt aaaagccttt aaaaacgttt 60
ttaaggggtt tgtagacaag gtaaaggata aaacagcaca attccaagaa aaacacgatt 120
tagaacctaa aaagaacgaa tttgaactaa ctcataaccg agaggtaaaa aaagaacgaa 180
gtcgagatca gggaatgagt ttataaaata aaaaaagcac ctgaaaagggt gtcttttttt 240
gatggttttg aacttgttct ttcttatctt gatacatata gaaataacgt catttttatt 300
ttagttgctg aaaggtgctg tgaagtgttg gtatgtatgt gttttaaagt attgaaaacc 360
cttaaaattg gttgcacaga aaaaccccat ctgttaaagt tataagtac caaacaata 420
actaaataga tgggggttcc ttttaatat atgtgtccta atagtagcat ttattcagat 480
gaaaaatcaa gggtttttagt ggacaagaca aaaagtggaa aagtgagacc atggagagaa 540
aagaaaatcg ctaatgttga ttactttgaa cttctgcata ttcttgaatt taaaaaggct 600
gaaagagtaa aagattgtgc tgaaatatta gagtataaac aaaatcgtga aacaggcgaa 660
agaaagttgt atcgagtgtg gttttgtaaa tccaggcttt gtccaatgtg caactggagg 720

```

[0002]

agagcaatga aacatggcat tcagtcacaa aaggttggtg ctgaagttat taaacaaaag	780
ccaacagttc gttggttggt tctcacatta acagttaaaa atgtttatga tggcgaagaa	840
ttaaataaga gtttgtcaga tatggctcaa ggatttcgcc gaatgatgca atataaaaaa	900
attaataaaa atcttggttg ttttatgctg gcaacggaag tgacaataaa taataaagat	960
aattcttata atcagcacat gcatgtattg gtatgtgtgg aaccaactta ttttaagaat	1020
acagaaaact acgtgaatca aaaacaatgg attcaatttt ggaaaaaggc aatgaaatta	1080
gactatgatc caaatgtaaa agttcaaatg attcgaccga aaaataaata taaatcggat	1140
atacaatcgg caattgacga aactgcaaaa tatcctgtaa aggatcggga ttttatgacc	1200
gatgatgaag aaaagaattt gaaacgtttg tctgatttgg aggaaggttt acaccgtaa	1260
aggttaatct cctatgggtg tttgttaaaa gaaatacata aaaaattaaa ccttgatgac	1320
acagaagaag gcgattgat tcatcacagat gatgacgaaa aagccgatga agatggattt	1381
tctattattg caatgtggaa ttgggaacgg aaaaattatt ttattaaaga gtagttcaac	1440
aaacgggcca tattgttgta taagtgatga aatactgaat ttaaaactta gtttatatgt	1500
ggtaaaatgt tttaatcaag tttaggagga attaattatg aagtgtaatg aataatgaat	1560
gtaacagggt tcaattaaaa gagggaagcg tatcattaac cctataaact acgtctgcc	1620
tcattattgg agggtgaaat gtgaatacat cctattcaca atcgaattta cgacacaacc	1680
aaattttaat ttggctttgc attttatctt tttttagcgt attaaatgaa atggttttga	1740
acgtctcatt acctgatatt gcaaatgatt ttaataaacc acctgcgagt acaaactggg	1800
tgaacacagc ctttatgtta acctttcca ttggaacagc tgtatatgga aagctatctg	1860
atcaattagg catcaaaagg ttactcctat ttggaattat aataaattgt ttcgggtcgg	1920
taattgggtt tgttgccat tctttctttt ccttacttat tatggctcgt tttattcaag	1980
gggctgggtc agctgcattt ccagcactcg taatggttgt agttgcgcgc tatattcaa	2040
aggaaaatag gggtaaagca tttggtctta ttggatcgat agtagccatg ggagaaggag	2100
tcggtccagc gattgggtga atgatagccc attatattca ttggtcctat cttctactca	2160
ttcctatgat acaattatc actgttccgt ttcttatgaa attattaaag aaagaagtaa	2220
ggataaaagg tcattttgat atcaaaggaa ttataactaat gtctgtaggc attgtatfff	2280
ttatgttggt tacaacatca tatagcattt cttttcttat cgttagcgtg ctgtcattcc	2340
tgatatttgt aaaacatc aggaaagtaa cagatccttt tgttgatccc ggattaggga	2400
aaaatatacc ttttatgatt ggagtcttt gtgggggaat tatatttgga acagtagcag	2460
ggtttgtctc tatggttctt tatatgatga aagatgttca ccagctaagt actgccgaaa	2520
tcggaagtgt aattattttc cctggaacaa tgagtgtcat tattttcggc tacattggtg	2580
ggatacttgt tgatagaaga ggtcctttat acgtgttaaa catcggagtt acatttcttt	2640
ctgtagctt tttactgct tctttcttt tagaaacaac atcatggttc atgacaatta	2700
taatcgtatt tgttttaggt gggcttctg taccacaaac agttatatca acaattggtt	2760
caagtagctt gaacagcag gaagctgggt ctggaatgag tttgcttaac tttaccagct	2820

[0003]

ttttatcaga	gggaacaggt	attgcaattg	taggtggttt	attatccata	cccttacttg	2880
atcaaaggtt	gttacctatg	gaagttgatc	agtcaactta	tctgtatagt	aatttgttat	2940
tacttttttc	aggaatcatt	gtcattagtt	ggctggttac	cttgaatgta	tataaacatt	3000
ctcaaaggga	tttctaaatc	gttaagggat	caactttggg	agagagtca	aaattgatcc	3060
tttttttata	acaggaattt	ctagcggtac	cctggctgaa	aacattgagc	ctttgatgac	3120
tgatgatttg	gctgaagaag	tggatcgatt	gtttgagaaa	agaagaagac	cataaaaata	3180
ccttgtctgt	catcagacag	ggatattttt	atgctgtcca	gactgtccgc	tgtgtaaaaa	3240
taaggaataa	aggggggttg	ttattatttt	actgatatgt	aaaatataat	ttgtataaga	3300
aatgagagg	gagaggaaac	atgattcaaa	aacgaaagcg	gacagtttcg	ttcagacttg	3360
tgcttatgtg	cacgctgtta	tttgtcagtt	tgccgattac	aaaaacatca	gccgtaaatg	3420
ggccccgaatt	cattggatcc	tacgtaaagc	ttctgcagga	gctcgtcgac	actagttctc	3480
gagcagctgg	aagctgagtt	ggctgctgcc	accgctgagc	aataactagc	ataaccctt	3540
ggggcctcta	aacgggtcct	gaggggtttt	ttgctgaaag	gaggaatcat	gacccaaaatc	3600
ccttaacgtg	agttttcgtt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	3660
tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaate	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	3720
ccagcgggtg	ttgttttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	ttttccgaa	ggtaactggc	3780
ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	3840
ttcaagaact	ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgtctgc	taatcctggt	accagtggtc	3900
gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttgact	caagacgata	gttaccggat	3960
aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	4020
acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccga	4080
gggagaaagg	eggacaggta	tccgtaagc	ggcagggtcg	gaacaggaga	gcgcacgagg	4140
gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtctctg	tcgggtttcg	ccacctctga	4200
cttgagcgtc	gatttttgtg	atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	4260
aacgcggcct	ttttacgggt	cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	4320
gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgctt	ttgagtgagc	tgataccgct	4380
cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcgag	tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgccctg	4440
atgcggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	ggta			4474

<210> SEQ ID NO: 3

5'-AATTACCGGGTACCCTGGCTGAAAACATTGAGCC-3'

<210> SEQ ID NO: 4

5'-AATCCGCGGCTCGAGAACTAGTGTGACGAGCTCCTGCAGAAGCTT
TACGTAGGATCCAATGAATTCGAATTCGGGCCCATTTACGGCTGATG-3'

[0004]

<210> SEQ ID NO: 5

5'-ATCTCGAGCAGCTGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGC
AATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
TGCTGAAAGGAGGAAT CATGACCAAA ATCCCTTAAC-3'

<210> SEQ ID NO: 6

5'-ATAGGCCTTACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC GCATCAG
GCG CTCTTCCGCT TCC-3'

<210> SEQ ID NO: 7

5'-ATAGGCCTGCTAGAAATTCCTTAAGG-3'

<210> SEQ ID NO: 8

5'-ATCTCGAGAATGCATGGTACCGCTAGAAATTCCTGTTATAAAAAA
GGATC-3'

<210> SEQ ID NO: 9

5'-AATGAATTCATGGCAAATACTTGGAGC-3'

<210> SEQ ID NO: 10

5'-AATAAGCTTTTACCCAACACCACAATAAC-3'

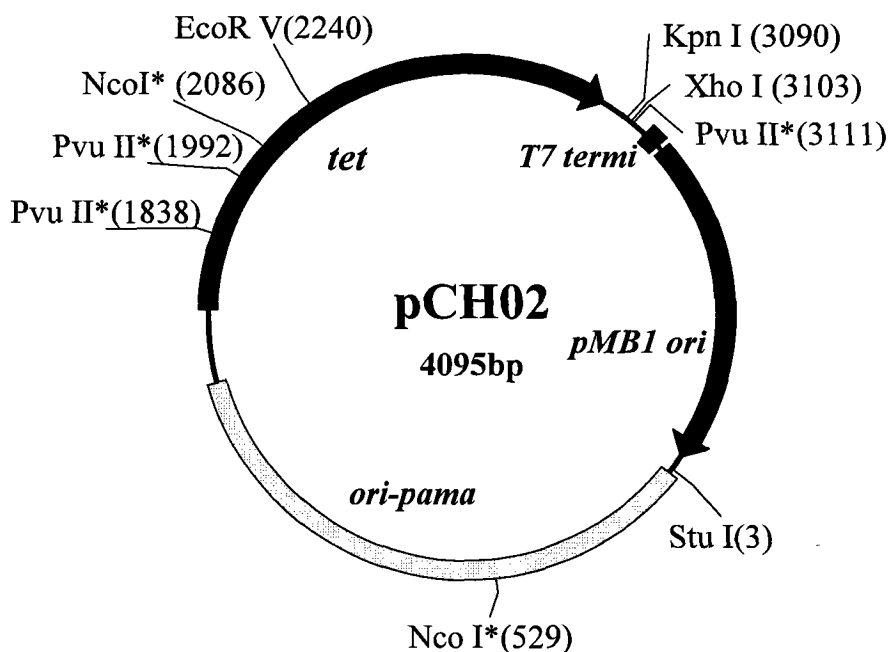


图 1

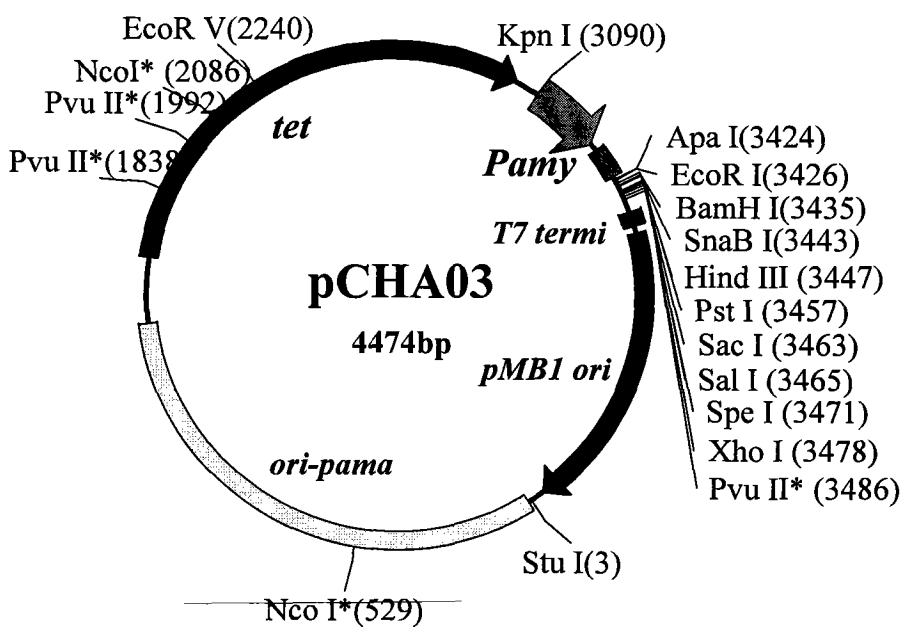


图 2