



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112011488 A

(43) 申请公布日 2020.12.01

(21) 申请号 202010961936.6

A23K 10/18 (2016.01)

(22) 申请日 2020.09.14

C12R 1/07 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO.M 2020018 2020.01.07

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238号

(72) 发明人 张彦娇 欧伟豪 赵思帆 艾庆辉
张文兵 麦康森

(74) 专利代理机构 北京科家知识产权代理事务
所(普通合伙) 11427

代理人 梁正贤

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 50/80 (2016.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页

(54) 发明名称

一株芽孢杆菌E62及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一株芽孢杆菌E62及其应用,属于水产养殖饲料益生菌添加剂技术领域,该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC M 2020018。本发明通过体内实验验证了分离自大菱鲆肠道的芽孢杆菌E62在大菱鲆幼鱼饲料中的益生效果。芽孢杆菌E62具有改善大菱鲆幼鱼肠道健康,促进其肠道消化吸收,提高其肠道抗氧化能力,增强其肠道黏膜屏障功能,提高其抗病力的优点。

1. 一株芽孢杆菌E62,其特征在于该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC M 2020018。
2. 根据权利要求1所述的一株芽孢杆菌E62,其特征在于所述芽孢杆菌E62的16S rDNA序列见SEQ NO.1。
3. 权利要求1所述的一株芽孢杆菌E62在大菱鲆幼鱼饲料中的应用。
4. 一种含有权利要求1所述芽孢杆菌E62的大菱鲆幼鱼饲料,其特征在于所述芽孢杆菌E62的活菌数为 1×10^8 CFU/g饲料。
5. 权利要求1所述的芽孢杆菌E62在制备改善大菱鲆幼鱼肠道健康微生态制剂中的应用。
6. 一种含有权利要求1所述芽孢杆菌E62的微生态制剂。

一株芽孢杆菌E62及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于水产饲料益生菌添加剂技术领域,具体涉及从大菱鲆肠道中分离一株芽孢杆菌E62 (*Bacillus* sp.E62) 及其在改善大菱鲆幼鱼肠道健康和提高抗病力中的应用。

背景技术

[0002] 我国水产养殖产量占世界总产量的70%,是水产养殖大国,并仍处于快速发展中。但与之相矛盾的是鱼粉资源的极度短缺,因此大量的植物蛋白源被广泛的应用在水产饲料中。但植物蛋白源的应用容易引起养殖鱼类尤其是肉食性鱼类的健康问题,这其中肠炎是最主要的问题。肠道是动物重要的消化吸收器官、免疫器官和内分泌器官,是机体内外环境之间信息交流和物质交换的重要场所,健康的肠道对鱼体的生长和健康而言至关重要。所以,肠炎的发生不仅会严重损害肠道健康,例如削弱对营养物质的消化吸收和破坏肠道的抗氧化功能,而且还会降低鱼类的免疫功能和抗病力,严重损害鱼体健康。而高密度的集约化养殖模式是目前及一段时间内主要的水产养殖模式,鱼体健康受到损害后极易引起大规模病害的发生。为了快速消灭病害,许多抗生素曾被滥用于水产养殖中,导致了很多严重的问题,例如细菌耐药性增强、污染环境、危害人体健康等。我国自2020年7月1日起,饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料。所以,寻找健康无害且绿色环保的抗生素替代品已经成为水产养殖业的热点和难点。

[0003] 由于肠道微生物是在动物生长过程中,与动物机体、环境和食物等相互作用而形成的复杂而动态变化的微生物区系,对保护肠道健康具有重要作用,因此在众多的抗生素替代品中,从动物肠道微生物中筛选分离的益生菌具有诱人的发展前景,其不但符合宿主特异性,更有利于其被摄食后重新粘附于动物肠道中发挥作用。肠道黏膜屏障是维持肠道稳态的主要防御性屏障,而肠道上皮细胞之间的紧密连接是肠道黏膜屏障的重要组成部分。许多研究证明肠道粘膜屏障、肠道菌群和肠炎之间存在着密切的联系,肠道菌群稳态失衡和肠道黏膜屏障的破坏是动物肠炎发生的首要原因。所以调节肠道菌群平衡、增强肠道黏膜屏障功能进而改善肠道健康、提高机体免疫水平是促进鱼类健康养殖的重要保证。

[0004] 许多研究和应用表明,在饲料中添加益生菌,尤其是添加从动物肠道中分离的益生菌,可以通过帮助宿主消化吸收营养物质、改善肠道黏膜屏障功能、降低肠腔内的pH值、促进有益菌的粘附、竞争性排斥致病菌、分泌抗菌物质、调节肠道和机体免疫系统等发挥其益生作用。目前常用的益生菌主要包括乳酸菌、酵母菌和芽孢杆菌等,而芽孢杆菌由于其能产生芽孢,具有较强的抗逆性,是比较理想的益生菌。因此,目前水产养殖业急需分离和筛选出能保护肠道健康和增强抗病力的芽孢杆菌,使其以饲料益生菌添加剂的形式调节肠道菌群结构、增强肠道的消化吸收和抗氧化能力、增强肠道黏膜屏障功能,保证肠道的健康以及提高抗病力。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一株芽孢杆菌E62及其应用,本发明菌株在应用

后能够改善大菱鲂的肠道菌群,促进肠道健康,提高大菱鲂的消化吸收和抗氧化能力,增强肠道黏膜屏障功能,提高免疫力和抗病力,从而保护了鱼体健康。

[0006] 本发明是通过如下技术方案来实现的:

[0007] 一株芽孢杆菌E62,该菌株已于2020年1月7日保藏在中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC),保藏号为CCTCC M 2020018。

[0008] 进一步,所述芽孢杆菌E62的16S rDNA序列见SEQ NO.1。

[0009] 本发明还提供所述芽孢杆菌E62在大菱鲂幼鱼饲料中的应用。

[0010] 本发明还提供一种含有所述芽孢杆菌E62的大菱鲂幼鱼饲料,其中所述的芽孢杆菌E62的活菌数为 1×10^8 CFU/g饲料。

[0011] 本发明还提供所述芽孢杆菌E62在制备改善大菱鲂幼鱼肠道健康微生态制剂中的应用。

[0012] 一种含有所述芽孢杆菌E62的微生态制剂。

[0013] 本发明与现有技术相比的有益效果:

[0014] 本发明通过体内实验验证了分离自大菱鲂肠道的芽孢杆菌E62在大菱鲂幼鱼饲料中的益生效果。芽孢杆菌E62具有改善大菱鲂幼鱼肠道健康,促进其肠道消化吸收,提高其肠道抗氧化能力,增强其肠道黏膜屏障功能,提高其抗病力等优点。

具体实施方式

[0015] 以下实施例用于说明本发明,但本发明的保护范围不受实施例任何形式上的限制。

[0016] 实施例1芽孢杆菌E62的分离和分子鉴定

[0017] 在无菌操作条件下收集大菱鲂新鲜肠道样品,挤出肠道内容物,用无菌PBS把肠道冲洗干净。在无菌匀浆器中加入适量的无菌PBS,将样品放入其中进行匀浆,匀浆液在80℃水浴10min。利用无菌PBS把得到的肠道匀浆液按1:10的比例进行梯度稀释,分别取100μl各浓度梯度的肠道匀浆液,分别均匀涂布于胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基,28℃培养,待平板上长出单菌落后,用接种环挑取单菌落进行划线以纯化菌株。挑取纯化后的单菌落到胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基中,28℃200rpm培养18h。取适量该菌液,提取细菌基因组DNA后,用16S rDNA全长引物27F和1492R扩增该菌株的16S rDNA全长。PCR反应体系:Premix Taq(Ex Taq Version 2.0plus dye)12.5μl,基因组DNA1μl,ddH₂O 9.5μl,Forward primer 1μl,Reverse primer 1μl。PCR程序:98℃10s,55℃30s,72℃2min,共30个循环;72℃10min。PCR产物送去生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将获得的16S rDNA全长序列在www.ezbiocloud.net网站上进行比对,初步鉴定为芽孢杆菌属(Bacillus sp.),将其编号为E62。

[0018] 芽孢杆菌E62(Bacillus sp.E62)于2020年1月7日保藏在中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC),保藏号为CCTCC M 2020018,16S rDNA序列:

[0019] cgagcggattgatgggagcttgctcccatcagtcagcggcggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcctgtaagactgggataactccgggaaaccggggctaataaccggataactcatttctctcgcatgaggaaatgttgaaggtggcttttagctatcacttacagatggaccgcggcgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaag

gcgacgatgcgtagccgacctgagagggtgatcggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagg
 cagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgcccgctgagtgatgaaggttttcggatc
 gtaaaactctgttgttagggaagaacaagtaccgttcgaataggcggtaccttgacggtacctaaccagaaagcc
 acggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgttaggtggcaagcgttgtccggaattattgggcgtaaagcgc
 gcgcaggtggttccttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactggggaacttg
 agtgcagaagaggaaagtggaattccaagtgtagcggtgaaatgcgtagatatttgaggaaacaccagtggcgaag
 gcgactttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcc
 acgccgtaaacgatgagtgctaagtgttaggggtttccgccccttagtgctgcagctaacgcattaagcactccg
 cctggggagtacggctcgcaagactgaaactcaaaggaattgacggggggcccgcaaacgggtggagcatgtggttt
 aattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatcctctgacaaccttagagatagggtttccccttcg
 ggggacagagtgacaggtggtgcatggttgtcgtcagctcgtgctgagatgttgggttaagtcccgcaacgagc
 gcaaccttgatcttagttgccagcattcagttgggcactcctaagatgactgccggtgacaaaccggaggaaggtg
 gggatgacgtcaaatcatcatgcccttatgacctgggctacacacgtgtacaatggacggtacaaagggcagca
 agaccgcgaggtttagccaatcccataaaaccgttctcagttcggattgtaggctgcaactcgcctacatgaagct
 ggaatcgctagtaatcgcggtcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggcctgtacacaccgcccgtcacacc
 acgagagtttgtaacacccgaagtcggtgaggtaaccttttgagaccagccgcctaa。

[0020] 实施例2菌株E62的生理生化鉴定

[0021] 菌株E62呈杆状,革兰氏染色阳性,在TSA培养基上单菌落圆形、淡粉黄色。以API细菌鉴定系统测定菌株E62的生理生化指标。菌株E62具有蛋白酶和β-半乳糖苷酶活性,能同化葡萄糖、葡萄糖酸盐和苹果酸,可以利用核糖、D-木糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖和5-酮基-葡萄糖酸盐产酸。主要生理生化特征见表1和表2。结合生理生化结果和上述的16S rDNA测序结果,菌株E62初步鉴定为芽孢杆菌属(Bacillus sp.)。

[0022] 表1菌株E62生理生化特性-酶活、碳源同化

检测项目	检测结果
NO3 硝酸盐还原到亚硝酸盐	W
TRP 吲哚	-
GLU 酸化葡萄糖	-
ADH 精氨酸双水介酶	-
URE 脲酶	-
ESC 水解七叶灵(β-葡萄糖苷酶)	-
[0023] GEL 水解明胶(蛋白酶)	+
PNPG β-半乳糖苷酶	+
GLU 同化葡萄糖	+
ARA 同化阿拉伯糖	-
MNE 同化甘露糖	-
MAN 同化甘露醇	W
NAG 同化 N-乙酰-葡萄糖胺	-
MAL 同化麦芽糖	W

	GNT 同化葡萄糖酸盐	+
	CAP 同化癸酸	-
[0024]	ADI 同化己二酸	-
	MLT 同化苹果酸	+
	CIT 同化柠檬酸	-
	PAC 同化苯乙酸	-

[0025] +: 阳性反应; -: 阴性反应; W: 弱阳性反应

[0026] 表2菌株E62生理生化特性-利用碳源产酸

试剂条对应管/底物	检测结果	试剂条对应管/底物	检测结果
0 对照	-	25 七叶灵	-
1 甘油	-	26 柳醇	-
2 赤癣醇	-	27 纤维二糖	-
3 D-阿拉伯糖	-	28 麦芽糖	+
4 L-阿拉伯糖	-	29 乳糖	-
5 核糖	+	30 蜜二糖	-
6 D-木糖	+	31 蔗糖	+
7 L-木糖	-	32 海藻糖	+
8 阿东醇	-	33 菊糖	-
9 β -甲基-D-木糖甙	-	34 松叁糖	-
10 半乳糖	-	35 棉子糖	-
[0027] 11 葡萄糖	+	36 淀粉	w
12 果糖	+	37 糖原	w
13 甘露糖	-	38 木糖醇	-
14 山梨糖	-	39 犏牛儿糖	-
15 鼠李糖	-	40 D-松二糖	-
16 卫茅醇	-	41 D-来苏糖	-
17 肌醇	-	42 D-塔格糖	-
18 甘露醇	-	43 D-岩糖	-
19 山梨醇	-	44 L-岩糖	-
20 α -甲基-D-甘露糖甙	-	45 D-阿拉伯糖醇	-
21 α -甲基-D-葡萄糖甙	-	46 L-阿拉伯糖醇	-
22 N-乙酰-葡糖胺	-	47 葡萄糖酸盐	-
23 苦杏仁甙	-	48 2-酮基-葡萄糖酸盐	-
[0028] 24 熊果甙	-	49 5-酮基-葡萄糖酸盐	+

[0029] +: 阳性, -: 阴性, w: 弱阳性

[0030] 实施例3含有该芽孢杆菌E62的大菱鲂幼鱼饲料的制备

[0031] 将于-80℃中保存的E62菌种拿出,立即放入37℃水浴锅中水浴3-5min使其化冻,取菌液划线接种于TSA培养基上,在28℃下复苏培养。待其长出单菌落后,挑取单菌落接种于25ml TSB培养基培养18h(200rpm,28℃),取200μl菌液均匀涂布于芽孢制备固体培养基上(芽孢制备固体培养基:大豆蛋白胨3.3g/l,牛肉膏1.0g/l,氯化钠5.0g/l,氯化钾1.0g/l,磷酸氢二钾2.0g/l,七水合硫酸镁0.25g/l,硫酸锰0.01g/l,乳糖5g/l,琼脂15g/l;121℃灭菌20min。),28℃培养7天,然后每个平板加入5ml无菌超纯水,用无菌药匙刮取收集培养基表面的芽孢菌落,收集的芽孢悬液在85℃水浴15min,用无菌超纯水离心洗涤3次(4300g,10min,4℃),最后将芽孢重悬于无菌超纯水中,即制得芽孢杆菌E62的芽孢悬液,于4℃避光保存。

[0032] 实验所用的大菱鲂幼鱼的基础饲料(表3)大致与普通商业大菱鲂幼鱼饲料的原料比例相同:鱼粉36%,豆粕15.68%,玉米蛋白粉8%,谷朊粉5.12%,花生粕3.2%,啤酒酵母2.5%,小麦粉17.63%,牛磺酸1%,蛋氨酸0.26%,苏氨酸0.18%,组氨酸0.19%,赖氨酸0.74%,鱼油7%,大豆卵磷脂1%,维生素矿物质混合物1%,氯化胆碱0.25%,乙氧基喹啉0.05%,丙酸钙0.1%,三氧化二钼0.1%。将上述原料均用80目网筛进行筛选,再按照逐级放大的顺序混匀,加入纯水揉匀,使用颗粒饲料制粒机进行制粒,将制得的颗粒饲料于风热烘干机中55℃恒温干燥8h,置于-20℃冰箱保存。

[0033] 将于4℃保存的芽孢杆菌E62的芽孢悬液取出,梯度稀释后在TSA培养基上进行活菌平板计数。加适量无菌超纯水稀释芽孢悬液,将稀释后的芽孢悬液均匀喷涂于基础饲料中,混匀,使其添加在饲料中的含量为 1×10^8 CFU/g,于50℃放置5-6h烘干,即制得含有芽孢杆菌E62的饲料。对照组饲料为在基础饲料中喷涂等体积无菌超纯水,混匀,于50℃放置5-6h烘干。

[0034] 表3基础饲料配方

[0035]

成分	含量(%)
鱼粉	36
豆粕	15.68
玉米蛋白粉	8
谷朊粉	5.12
花生粕	3.2
啤酒酵母	2.5
小麦粉	17.63
牛磺酸	1
蛋氨酸	0.26
苏氨酸	0.18
组氨酸	0.19
赖氨酸	0.74
鱼油	7
大豆卵磷脂	1
多维多矿混合物 ¹	1
氯化胆碱	0.25

乙氧基喹林	0.05
丙酸钙	0.1
三氧化二钨	0.1

[0036] 1 多维多矿混合物 (mg或g/kg饲料): 维生素A乙酸酯, 232.2mg; 维生素D3, 3.75mg; d1- α -生育酚乙酸酯, 6g; 甲萘醌, 1.2g; 硝酸硫胺, 0.9g; 核黄素, 1.35g; 盐酸吡哆醇, 1.05g; 氰钴胺, 7.5mg; D-泛酸钙, 4.5g; 烟酸胺, 6.75g; 叶酸, 0.375g; D-生物素, 0.015g; L-抗坏血酸, 15g; 肌醇, 10g; 硫酸亚铁, 20g; 硫酸锌, 9.6g; 硫酸锰, 5g; 硫酸铜, 0.6g; 氯化钴, 80mg; 亚硒酸钠, 40mg; 碘酸钙, 80mg。

[0037] 实施例4芽孢杆菌E62在大菱鲆幼鱼饲料上的应用效果

[0038] 实验选择体重相似的大菱鲆幼鱼为实验对象, 将180尾鱼随机分至六个桶, 每桶30尾鱼。对照组投喂对照组饲料, 实验组投喂在基础饲料中添加 1×10^8 CFU/g芽孢杆菌E62的饲料, 每组3个桶。每天表观饱食投喂大菱鲆2次 (7:00和16:00), 实验周期为8周, 实验期间记录饲料投喂量, 分别在养殖开始和结束时称重, 计算大菱鲆特定生长率、饲料效率和摄食率。实验结束后, 对对照组和添加芽孢杆菌E62组的鱼 (每处理3桶, 每桶10尾) 分别腹腔注射100 μ l浓度为 1×10^6 CFU/ml的迟缓爱德华氏菌菌液, 观察各组大菱鲆14天攻毒死亡率, 期间正常投喂各组饲料。试验数据以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm S.E.) 表示, 试验结果用IBM SPSS Statistics 25软件进行独立样本T检验分析。表中数据同行不同上标字母表示存在显著差异 (P<0.05)。实验结果显示, 摄食添加芽孢杆菌E62的大菱鲆处理组的摄食率显著大于对照组 (P<0.05) (表4)。对于大菱鲆后肠消化功能, 芽孢杆菌E62的添加显著提高了大菱鲆后肠的胰蛋白酶和淀粉酶活性 (P<0.05) (表5)。对于大菱鲆后肠抗氧化能力, 添加芽孢杆菌E62的处理组中后肠总抗氧化力和超氧化物歧化酶活性显著高于对照组 (P<0.05) (表6)。与对照组相比, 摄食芽孢杆菌E62的大菱鲆幼鱼有显著更高的后肠上皮细胞间紧密连接蛋白Claudin-4、Occludin和Tricellulin的基因表达水平 (P<0.05) (表7)。相比于对照组, 芽孢杆菌E62的添加显著降低了大菱鲆幼鱼攻毒后的死亡率 (P<0.05) (表8), 提高了大菱鲆幼鱼对于致病菌迟缓爱德华氏菌的抵抗力。综上, 相比于对照组, 芽孢杆菌E62的添加显著提高了大菱鲆幼鱼肠道的消化和抗氧化能力, 增强了大菱鲆幼鱼的肠道粘膜屏障功能, 改善了大菱鲆幼鱼的肠道健康, 提高了大菱鲆幼鱼对致病菌的抵抗力, 有利于改善大菱鲆幼鱼的整体健康状况。

[0039] 表4芽孢杆菌E62对大菱鲆幼鱼生长性能的影响

	对照组	基础饲料加芽孢杆菌 E62 组
初始均重 (g)	12.04 \pm 0.04	12.04 \pm 0.01
终末均重 (g)	39.72 \pm 1.40	41.64 \pm 2.16
[0040] 特定生长率 (%/天)	2.13 \pm 0.07	2.08 \pm 0.09
摄食率	1.56 \pm 0.02 ^a	1.61 \pm 0.00 ^b
饲料效率	1.22 \pm 0.04	1.16 \pm 0.04

[0041] 注: 表中数据同行不同上标字母表示存在显著差异 (P<0.05)。

[0042] 表5芽孢杆菌E62对大菱鲃幼鱼后肠消化功能的影响

	对照组	基础饲料加芽孢杆菌 E62 组
胰蛋白酶 (U/mgprot)	593.45±78.22 ^a	4662.29±493.78 ^b
亮氨酸氨基肽酶 (U/mgprot)	28.82±2.03	44.67±7.34
[0043] 淀粉酶 (U/mgprot)	2.75±0.43 ^a	6.50±1.06 ^b
麦芽糖酶 (U/mgprot)	76.15±9.29	81.76±10.05
Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 (U/mgprot)	0.28±0.07	0.30±0.04

[0044] 注:表中数据同行不同上标字母表示存在显著差异 (P<0.05)。

[0045] 表6芽孢杆菌E62对大菱鲃幼鱼后肠抗氧化功能的影响

	对照组	基础饲料加芽孢杆菌 E62 组
总抗氧化力 (mmol/g)	0.15±0.02 ^a	0.27±0.02 ^b
[0046] 过氧化氢酶 (U/mgprot)	30.30±1.37	30.67±1.61
超氧化物歧化酶 (U/mgprot)	37.08±3.32 ^a	61.70±4.83 ^b
丙二醛	0.96±0.10	0.79±0.09

[0047] 注:表中数据同行不同上标字母表示存在显著差异 (P<0.05)。

[0048] 表7芽孢杆菌E62对大菱鲃幼鱼后肠紧密连接蛋白相关基因表达量的影响

	对照组	基础饲料加芽孢杆菌 E62 组
Claudin-3	1.00±0.03	1.06±0.16
[0049] Claudin-4	1.00±0.02 ^a	2.89±0.29 ^b
Occludin	1.00±0.04 ^a	1.67±0.20 ^b
Tricelluin	1.00±0.02 ^a	1.21±0.05 ^b

[0050] 表8芽孢杆菌E62对大菱鲃幼鱼抵抗致病菌的影响

	对照组	基础饲料加芽孢杆菌 E62 组
[0051] 死亡率 (%)	83.33% ^a	35.00% ^b

[0052] 注:表中数据同行不同上标字母表示存在显著差异 (P<0.05)。

序列表

<110> 中国海洋大学

<120> 一株芽孢杆菌E62及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1417

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌E6216S rDNA (Bacillus sp. E62)

<400> 1

```

cgagcggatt gatgggagct tgetcccatc agtcagcggc ggacgggtga gtaacacgtg 60
ggtaacctgc ctgtaagact gggataactc cgggaaaccg gggctaatac cggataactc 120
atctcctcgc atgaggaaat gttgaaaggt ggcttttagc tactacttac agatggacc 180
gcggcgcatt agctagttag tgaggtaacg gtcaccaag gcgacgatgc gtagccgacc 240
tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 300
agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gtagtgatgaa 360
ggttttcggg tcgtaaaaact ctgttgtagt ggaagaacaa gtaccgttcg aatagggcgg 420
taccttgacg gtacctaac agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat 480
acgtaggtgg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gcgcgcgcag gtggttcctt 540
aagtctgatg taaaagccca cggctcaacc gtggagggtc attgaaact ggggaacttg 600
agtgacagaag aggaaagtgg aattccaagt gtagcggtag aatgcgtaga tatttgagg 660
aacaccagtg gcgaaggcga ctttctggtc tgtaactgac actgaggcgc gaaagcgtgg 720
ggagcaaaca ggattagata ccctgtagt ccacgccgta aacgatgagt gctaagtgtt 780
aggggggttc cgccccttag tgctgcagct aacgcattaa gactccgcc tggggagtac 840
ggtcgcaaga ctgaaactca aaggaattga cgggggccc cacaagcggg ggagcatgtg 900
gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctt ccaggtcttg acatcctctg acaaccctag 960
agatagggtt tccccttcg gggacagag tgacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc 1020
gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcga cccttgatct tagttgccag 1080
cattcagttg ggactctaa gatgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac 1140
gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg acggtacaaa 1200
gggcagcaag accgcgaggt ttagccaatc ccataaaacc gttctcagtt cggattgtag 1260
gctgcaactc gcctacatga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt 1320
gaatacgttc ccggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt gtaacaccgc 1380
aagtcggtga ggtaacctt tggagccagc cgcctaa 1417

```