



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109486835 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 11

(21) 申请号 201811481544.9
 (22) 申请日 2018.12.05
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109486835 A
 (43) 申请公布日 2019.03.19
 (73) 专利权人 中国科学院合肥物质科学研究院
 地址 230031 安徽省合肥市蜀山区蜀山湖
 路350号
 (72) 发明人 李鹿之 陈少鹏 吴李君
 (74) 专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务
 所(普通合伙) 34124
 代理人 王亚洲

(56) 对比文件
 CN 105802983 A, 2016.07.27
 CN 105112455 A, 2015.12.02
 CN 102027109 A, 2011.04.20
 CN 104004790 A, 2014.08.27
 NCBI.Nostoc punctiforme PCC 73102,
 complete genome-CP001037.1.《GenBank》
 .2014,第1-5页.
 岳海兵等.利用双报道基因筛选系统改造产
 烃基因工程细菌.《生物物理学报》.2014,第30卷
 (第6期),第424-432页.
 苏绍洁等.微生物法生产烷烃研究进展.《工
 业微生物》.2017,第47卷(第1期),第56-64页.

(51) Int. Cl.
 C12N 15/31 (2006.01)
 C12N 15/70 (2006.01)
 C12N 1/21 (2006.01)
 C07K 14/195 (2006.01)
 C12P 5/00 (2006.01)
 C12R 1/19 (2006.01)

A. Peramuna等.Enhancing Alkane
 Production in Cyanobacterial Lipid
 Droplets: A Model Platform for
 Industrially Relevant Compound
 Production.《Life》.2015,第5卷第1111-1126
 页.

审查员 朱碧薇

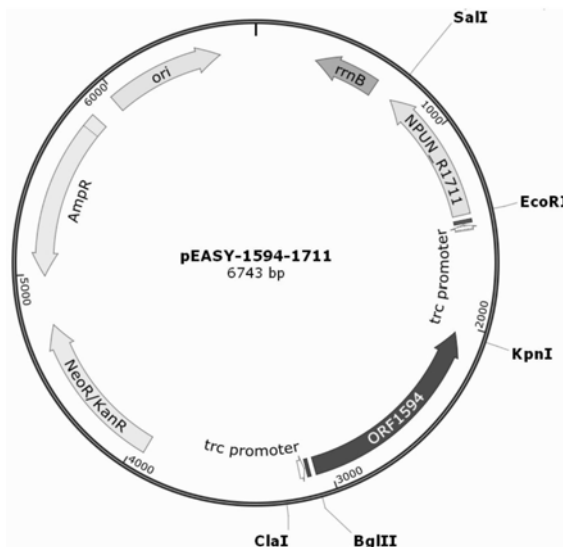
权利要求书1页 说明书7页
 序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子及其应用

(57) 摘要

本发明公开一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子,所述基因具有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列。本发明还公开一种以源于蓝藻的野生型产烷烃关键基因构建的质粒 pEASY-1594-1711为模板获得产烃关键基因突变子的方法以及应用。该产烃基因是源于蓝藻的野生型产烃基因的突变子,基于该产烃基因突变子的菌株的生物产烷烃总量较之野生型提高了2.9倍,从而提高生物产烷烃产率、降低生物产油成本,有助于加快生物产油商业化进程。



CN 109486835 B

1. 一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子,其特征在于,所述产烷烃关键基因突变子的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,或与如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列互补。

2. 根据权利要求1所述源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子,其特征在于,由所述产烷烃关键基因突变子的核苷酸序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 一种含有如权利要求1所述的源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子的重组载体。

4. 根据权利要求3所述含所述源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子的重组载体,其特征在于,所述重组载体为pEASY-1594-1711。

5. 一种工程菌,其特征在于,所述工程菌含有权利要求3所述的重组载体。

6. 一种如权利要求5所述的工程菌在生物产烷烃中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:

包括以下步骤:

(1) 将工程菌先于含有卡那霉素的LB平板进行活化,然后接种于5mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃,200rpm下过夜培养,获得起始菌液;

(2) 起始菌液按1 :100体积比接种于用含有卡那霉素的M9液体培养基中,于30℃,200rpm下培养;

(3) 培养7小时后,加入0.5M的诱导剂IPTG,再继续培养40小时;

(4) 菌液收集,即完成生物产烷烃。

一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程的生物能源领域,尤其涉及是一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子及其应用。

背景技术

[0002] 随着全球经济快速增长对能源需求的激增,石油等化石燃料资源不断减少,而伴随化石燃料燃烧造成的环境问题日益激增,可再生生物燃料的发展逐渐引起了人们的重视(G.Stephanopoulos,Challenges in engineering microbes for biofuels production, Science 315 (2007) 801-804)。生物能源作为一种可再生的能源,对其进一步的研究可缓解甚至最终消除能源危机。

[0003] 烷烃作为汽油、柴油、航空煤油的最主要成分,生物产烷烃更接近于现有的化石来源柴油,是十分理想的柴油替代品。烃在自然界中广泛存在,很多生物包括植物、藻类、真菌都能够产烃。例如,植物合成蜡质以防止水分蒸发,昆虫产生以烃为主要成分的信息素,在光合蓝藻中产生以十七烷烃为主要成分的烃(M.Dennis,P.E.Kolattukudy,Acobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO₂,Proceeding of the National Academy of Sciences 89(1992) 5306-5310;Mata TM,Martins AA,Caetano NS.Microalgae for biodiesel production and other applications:A review,Renewable and Sustainable Energy Reviews 14(2010) 217-32)。

[0004] 蓝藻产油相较于较早研究的油料农作物和林木等具有更加理想的发展前景。蓝藻是一类能够进行植物型产氧光合作用的原核微生物,作为新一代能源微生物系统其具有以下优势:(1)吸收太阳能、固定二氧化碳作为碳源生长,培养成本低、生命力强;(2)基因操作简单,可进行遗传改造;(3)单位生物质所含能量更高;(4)可在淡水、海水或污水中生长,不争夺土地和水源,对环境影响最低(5)。人类社会若要持续发展,终究需要可再生能源来取代不可再生的化石能源。蓝藻产生物柴油,一方面可以直接以太阳光作为能源,另一方面在生产生物柴油的过程固定CO₂作为碳源,可以缓解温室效应。因此蓝藻产生物柴油不仅可以缓解能源危机,并且可以缓解环境污染。

[0005] 尽管蓝藻产生物柴油有诸多巨大的优势,但其产业化进程却始终推行缓慢。蓝藻生物能源在发展中受很多因素的限制,比如昂贵的生物反应器,培养过程的花费,较高的富集费用,缺乏藻种培养以及生物燃料生产的标准方法等。高昂的生产成本是藻类产生物柴油所面临的首要瓶颈问题(V.L.Colin,A.Rodríguez,H.A.Cristobal,The role of synthetic biology in the design of microbial cell factories for biofuel production,Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011(2011) 1-9)。所以目前研究的热点在于筛选出高产油的蓝藻,缩短蓝藻的培养时间,简化培养条件,降低蓝藻产生物能源的成本。

[0006] 近年来,随着合成生物学和代谢工程的发展,人们利用遗传学、酶学及代谢工程手段通过改造微生物代谢途径提高蓝藻中脂肪烃的产量获得了许多进展。Tan等在蓝细菌中

过量表达ACC以提高细胞内脂酰ACP的含量,将蓝细菌脂肪烃产量提高了50% (X.Tan, L.Yao,Q.Gao,et al.Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria, *Metabolic Engineering* 13(2011)169-176)。Wang等通过在野生型集胞藻PCC6803中过表达两个拷贝脂酰ACP还原酶基因和脂肪醛去甲酰基加氧酶基因,使脂肪烃的产量比野生型提高了8倍 (W.Wang,X.Liu,X.Lu, *Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alkanes, Biotechnology for Biofuels* 6(2013)69)

[0007] 目前提高蓝藻中烷烃产量的方法主要是通过改造微生物代谢途径来实现的,这种进化方法虽然目的明确、可行性高,但是对进化设计思路要求极高并且无法对缺乏了解的目标物进行改造,使用受到了很大的限制,并且所获得的突变蓝藻菌株烷烃生产效率仍无法满足现代化商业应用的要求。定向进化技术不需要准确了解待进化物的分子机制及结构功能关系,而是通过引入随机突变和重组,人为制造出原本不存在的多样性突变子,并且按照特定的需要施以选择压力,筛选出具有期望特征的突变子,实现分子水平的模拟进化,进化更具有针对性且拥有更好的应用价值 (W.Johannes Tyler and H.M.Zhao, *Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways, Current Opinion in Microbiology* 9(2006)261-267)。

[0008] 随着人类社会的持续发展,可再生能源取代不可再生的化石能源是必然趋势。通过生物工程和遗传改造技术,利用定向进化手段获得高产烷烃基因的突变子,构建高产烷烃菌株。可以通过提高生物产油产率,降低生产成本,对实现蓝藻产烷烃的产业化具有重要的意义,并为人类解决能源危机并提供不竭的新型清洁能源。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,以解决现有的基于野生型产烃基因的生物产烷烃产量较低、难以满足产业化需求的不足的技术问题。

[0010] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子,所述基因具有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列。所述核苷酸序列编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0011] 本发明还公开一种含有上述源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子的重组载体,即突变后得到的重组载体。

[0012] 优选地,所述重组载体来源于pEASY-1594-1711。

[0013] 本发明还公开一种以源于蓝藻的野生型产烷烃关键基因构建的质粒pEASY-1594-1711为模板获得产烃基因突变子的方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 以野生型的pEASY-1594-1711质粒为模板,使用引物SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13对产烃关键基因npun_R1711进行易错PCR,并引入EcoRI和SalI两个酶切位点;

[0015] (2) 将纯化后的易错PCR产物经过EcoRI和SalI双酶切,与同样经过双酶切处理的pEASY-1594-1711于16℃连接过夜;

[0016] (3) 连接产物经电转化,导入E.coli DH5 α 感受态细胞(购于TaKaRa公司,货号9057),获得含有产烃关键基因的随机突变体文库。

[0017] 优选地,所述易错PCR的反应程序为:94℃预变性3min,94℃变性30s,65℃退火

45s,72℃延伸1.5min,25个循环后,再在72℃下继续延伸5min后,置于4℃下保存备用。

[0018] 优选地,连接体系中,插入片段和载体的摩尔比为3:1,或在每100ul连接体系中加入50ng载体以及25ng片段,连接反应条件为16℃连接5小时。

[0019] 本发明还公开一种工程菌,所述工程菌含有源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子的重组载体;所述基因具有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,或与如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0020] 本发明还提供了一种含有上述重组载体的工程菌在生物产烷烃中的应用。所述工程菌为含有所述重组载体的原核表达宿主Trans BL21 (DE3) (购于TRANSGEN公司,货号CD601),该工程菌可直接作为细菌产烷烃菌株,具体培养步骤包括:

[0021] (1) 将工程菌先于含有卡那霉素的LB平板进行活化,然后接种于5mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃,200rpm下过夜培养,获得起始菌液;

[0022] (2) 将步骤(1)的起始菌液按1:100接种于用含有卡那霉素的改良M9液体培养基中,于30℃,200rpm下培养;

[0023] (3) 将步骤(2)的培养7小时后,加入0.5M的诱导剂IPTG,再继续培养40小时;

[0024] (4) 将步骤(3)的菌液收集,即完成了生物产烷烃;

[0025] (5) 将菌液超声破碎,并离心收集上清,可对其中烷烃产量进行定量分析。

[0026] 本发明相比现有技术具有以下优点:该产烃基因是来源于蓝藻的野生型产烃基因的突变子,基于该产烃基因突变子的菌株的生物产烷烃总量较之野生型提高了2.9倍,从而提高生物产烷烃产率、降低生物产油成本,有助于加快生物产油商业化进程。

附图说明

[0027] 图1为含有产烷烃基因突变子的重组载体pEASY-1594-1711的质粒图谱;

[0028] 图2为GC-MS分析产烷烃基因突变子菌株与野生型菌株生物产烷烃的产量对比结果柱形图。

具体实施方式

[0029] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0030] 实施例1

[0031] 1、试验材料

[0032] 1) LB培养基的制备:

[0033] LB液体培养基:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠;

[0034] LB固体培养基:每升LB液体培养基中加入琼脂15g;

[0035] 卡那霉素抗性的LB固体培养基:将配置好的LB固体培养基加热完全溶解,待温度降至55℃左右加入总量2‰(v/v)的卡那霉素,而后缓缓倒入培养皿中,冷却凝固备用。

[0036] 2) 改良M9缓冲液:称取6g的 Na_2HPO_4 、3g的 KH_2PO_4 、0.5g的NaCl溶解并定容于1L超纯水中,高温高压灭菌获得A液。称取其成分分别单独高温高压或过滤灭菌,并于A液中加入以下组分:2g/L的 NH_4Cl 、0.25g/L的 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 、11mg/L的 CaCl_2 、27mg/L的 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 、

2mg/L的 $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、2mg/L的 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、1.9mg/L的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.5mg/L的 H_3BO_3 、1mg/L的thiamine、200mM Bis-Tris (PH 7.25) 和0.1% (v/v) 的Triton-X100,共同混合配置成1L的改良M9缓冲液。

[0037] 卡那霉素抗性的改良M9缓冲液液体培养基:在配置好的改良M9液体培养基中加入总量2‰ (v/v) 的卡那霉素。

[0038] 2、源于蓝藻的产烃关键基因的获得:

[0039] 1) 野生型产烃关键基因的获得:

[0040] 以质粒pAL112为模板,以SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所述的引物做PCR扩增,获得野生型产烃关键基因,所述质粒pAL112的获得方法参见Xuefeng Lu等人于2013年发表的论文(Aiqiu,Liu.,et al.,Fatty alcohol production in engineered E.coli Marinobacter fatty acyl-CoA reductases,Appl Microbiol Biotechnol,97(2013) 7061-7071.)。

[0041] SEQ ID NO:3:P1:AACCGCTCGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAAC;

[0042] SEQ ID NO:4:P2:AACCGCTCGAGCGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATG。

[0043] 2) 野生型产烃关键基因重组载体的构建

[0044] 细菌生物产烷烃需要同时包含两个关键产烃基因,为方便通过易错PCR和突变体文库建库技术对产烃基因进行研究,需在两个基因即orf1594和npun_R1711两端分别添加酶切位点,并且使用两个ptrc启动子对他们分别进行调控,构建如图1所示质粒pEASY-1594-1711。

[0045] (1) 以质粒pAL112为模板,使用引物SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4扩增含有两个产烃关键基因的片段,然后将PCR产物加“A”后连入T载体pEASY-T5,经测序鉴定,获得质粒pEASY-1594-1711-RC;

[0046] (2) 以质粒pEASY-1594-1711-RC为模板,使用了两端带有Bgl II 酶切位点的引物SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6扩增片段,然后将PCR产物自连,获得引入了酶切位点Bgl II 的质粒pEASY-1594-1711-RC-Bgl2;

[0047] (3) 以质粒pEASY-1594-1711-RC-Bgl2为模板,使用了两端带有EcoRI酶切位点的引物SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8扩增片段,然后将PCR产物自连,获得引入了酶切位点EcoRI的质粒pEASY-1594-1711-RC-Bgl2-EcoR1;

[0048] (4) 以质粒pEASY-1594-1711-RC-Bgl2-EcoR1为模板,分别以引物SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10扩增ptrc启动子,并引入ClaI酶切位点;以引物SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:11扩增载体,并引入ClaI酶切位点,通过将两端PCR产物双酶切并连接后,获得如图1所示的质粒pEASY-1594-1711。

[0049] 表1:GFP和AID的PCR引物及其酶切位点

编号	序列	酶切位点
SEQ ID NO: 5	CAGACCAGATCTATGGCATTTCGGTCTTATCGGTC	Bgl II
SEQ ID NO: 6	CAACGCagatctCGTAATAGCGAAGAGGCCCG	Bgl II
SEQ ID NO: 7	CAGACCGAATTCATGGCACAGCAGCTTACAGAC	EcoR I
[0050] SEQ ID NO: 8	CGCCATGAATTCGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	EcoR I
SEQ ID NO: 9	CAGACCAGATCTGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	Bgl II
SEQ ID NO: 10	CAACGCATCGATTCAAGGCGCACTCCCGTTCTG	Cla I
SEQ ID NO: 11	CAACGCATCGATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC	Cla I

[0051] 3) 定向进化获得产烃基因突变子

[0052] 以pEASY-1594-1711质粒为模板,使用引物对SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13对产烃关键基因npun_R1711进行易错PCR,并引入EcoRI和SalI两个酶切位点。将纯化后的易错PCR产物经过EcoRI和SalI双酶切,与经过同样双酶切处理的pEASY-1594-1711于16℃连接过夜。其中连接体系中,插入片段和载体的摩尔比为3:1,或在每100u1连接体系中加入50ng载体以及25ng片段,连接反应条件为16℃连接5小时;连接产物经电转化,导入E.coli DH5α感受态细胞(购于TaKaRa公司,货号9057),获得随机突变体文库。

[0053] 所述引物如下表2所示:

[0054] 表2:引物序列及其酶切位点

编号	序列	酶切位点
[0055] SEQ ID NO: 12	CAGGAAACAGACCGAATTCATGGCAC	EcoR I
SEQ ID NO: 13	GCATGCCTGCAGGTCGACTTAAGC	Sal I

[0056] 所述易错PCR的反应体系,见表3

[0057] 表3

	模板	1 μ L
	引物对(10 μ M)	1/1 μ L
	10 X Taq 缓冲液	5 μ L
	Taq 聚合酶	1 μ L
[0058]	Mgcl ₂ (25mM)	10 μ L
	Mncl ₂ (5mM)	2 μ L
	dNTPs(2.5Mm)	4 μ L
	dC+dT (20+20mM)	1.5 μ L
	加 ddH ₂ O	至 50 μ L

[0059] 所述易错PCR的反应程序为:94℃预变性3min,94℃变性30s,65℃退火45s,72℃延伸1.5min,25个循环后,再在72℃下继续延伸5min后,置于4℃下保存备用。

[0060] 经过10轮的传代稀释进化筛选,最终获得进化后的含有产烃基因突变子,将其转入表达宿主Trans BL21 (DE3) (购于TRANSGEN公司,货号CD601)即为进化后的生物产烷烃工程菌。

[0061] 3、进化后的产烃基因突变子生物产烷烃实验

[0062] 1) 将含有产烃基因野生型质粒的工程菌以及进化后含有突变子质粒的工程菌分别接种于含卡那霉素抗性的LB固体培养基平板上,37℃培养过夜;

[0063] 2) 挑取单菌落,接种于5mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,在37℃,200rpm下过夜培养,获得起始菌液;

[0064] 3) 将步骤(2)的起始菌液按1:100体积比接种于用含有卡那霉素的改良M9液体培养基中(100mL体系于250mL锥形瓶),于30℃,200rpm下培养;

[0065] 4) 步骤3)培养7小时后,加入0.5M的诱导剂IPTG,再继续培养40小时;

[0066] 5) 收集菌液,即完成了生物产烷烃;

[0067] 4、GC-MS检测进化后的产烃基因突变子生物产烷烃实验

[0068] 1) 将含有烷烃的菌液于超声破碎仪进行超声破碎30分钟(功率30%,10s on;5s off);

[0069] 2) 5000g离心10分钟,收集上清;

[0070] 3) 取2mL含有烷烃的培养基加入2mL含有7 μ g/mL二十碳烷烃作为内标的乙酸乙酯溶液,混合均匀;

[0071] 4) 于5000g离心10分钟,收集上层溶液,进行GC-MS分析;

[0072] 5) 同时配置各组分浓度均为7 μ g/mL的溶于乙酸乙酯的烷烃混合标样,进行GC-MS分析;

[0073] 结果如附图2所示,wt为含有野生型产烃基因的工程菌,M28为含有产烃基因突变子的工程菌。图中可以看出,进化后的产烃关键基因突变子的烷烃产量较之野生型有2.9倍的提升,说明进化后的产烃基因突变子提高了生物产烷烃产率。以进化后的产烃基因突变子菌株进行生物产烷烃,有望降低生物产油成本,有助于加快生物产油商业化进程。

[0074] 需要说明的是,在本文中,如若存在第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0075] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 中国科学院合肥物质科学研究院

[0003] <120> 一种源于蓝藻的产烷烃关键基因突变子及其应用

[0004] <130> 2018

[0005] <160> 13

[0006] <170> PatentIn version 3.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 702

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 人工序列

[0011] <400> 1

[0012] atggcacagc agcttacaga ccaatctaaa gaattagatt tcaagagcga aacatacaaaa 60

[0013] gatgcttata gccggattaa tgcgatcgtg attgaagggg aacaagaagc ccatgaaaat 120

[0014] tacatcacac tagcccaact gctgccagaa tctcatgatg aattgattcg cctatccaag 180

[0015] atggaaagcc gccataagaa aggatttgaa gcttgtgggc gcaathtagc tgttaccca 240

[0016] gatttgcaat ttgccaaaga gtttttctcc ggcctacacc aaaattttca aacagctgcc 300

[0017] gcagaaggga aagtggttac ttgtctgttg attcagtctt taattattga atgttttgcg 360

[0018] atcgcagcat ataacattta catccccgtt gccgacgatt tcgcccgtaa aattactgaa 420

[0019] ggagtagtta aagaagaata cagccacctc aattttggag aagtttggtt gaaagaacac 480

[0020] tttgcaggat ccaaagctga acttgaactt gcaaatcgcc agaacctacc catcgtctgg 540

[0021] aaaatgctca accaagaaga aggtgatgcc cacacaatgg caatggaaaa agatgctttg 600

[0022] gtagaagact tcatgattca gtatggtgaa gcattgagta acattggttt ttcgactcgc 660

[0023] gatattatgc gcttgtcagc ctacggactc ataggtgctt aa 702

[0024] <210> 2

[0025] <211> 233

[0026] <212> PRT

[0027] <213> 人工序列

[0028] <400> 2

[0029] Met Ala Gln Gln Leu Thr Asp Gln Ser Lys Glu Leu Asp Phe Lys Ser

[0030] 1 5 10 15

[0031] Glu Thr Tyr Lys Asp Ala Tyr Ser Arg Ile Asn Ala Ile Val Ile Glu

[0032] 20 25 30

[0033] Gly Glu Gln Glu Ala His Glu Asn Tyr Ile Thr Leu Ala Gln Leu Leu

[0034] 35 40 45

[0035] Pro Glu Ser His Asp Glu Leu Ile Arg Leu Ser Lys Met Glu Ser Arg

[0036] 50 55 60

[0037] His Lys Lys Gly Phe Glu Ala Cys Gly Arg Asn Leu Ala Val Thr Pro

[0038] 65 70 75 80

[0039]	Asp Leu Gln Phe Ala Lys Glu Phe Phe Ser Gly Leu His Gln Asn Phe
[0040]	85 90 95
[0041]	Gln Thr Ala Ala Ala Glu Gly Lys Val Val Thr Cys Leu Leu Ile Gln
[0042]	100 105 110
[0043]	Ser Leu Ile Ile Glu Cys Phe Ala Ile Ala Ala Tyr Asn Ile Tyr Ile
[0044]	115 120 125
[0045]	Pro Val Ala Asp Asp Phe Ala Arg Lys Ile Thr Glu Gly Val Val Lys
[0046]	130 135 140
[0047]	Glu Glu Tyr Ser His Leu Asn Phe Gly Glu Val Trp Leu Lys Glu His
[0048]	145 150 155 160
[0049]	Phe Ala Gly Ser Lys Ala Glu Leu Glu Leu Ala Asn Arg Gln Asn Leu
[0050]	165 170 175
[0051]	Pro Ile Val Trp Lys Met Leu Asn Gln Glu Glu Gly Asp Ala His Thr
[0052]	180 185 190
[0053]	Met Ala Met Glu Lys Asp Ala Leu Val Glu Asp Phe Met Ile Gln Tyr
[0054]	195 200 205
[0055]	Gly Glu Ala Leu Ser Asn Ile Gly Phe Ser Thr Arg Asp Ile Met Arg
[0056]	210 215 220
[0057]	Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ile Gly Ala
[0058]	225 230
[0059]	<210> 3
[0060]	<211> 31
[0061]	<212> DNA
[0062]	<213> 人工序列
[0063]	<400> 3
[0064]	aaccgctcga gtgccatgtc cggttttcaa c 31
[0065]	<210> 4
[0066]	<211> 36
[0067]	<212> DNA
[0068]	<213> 人工序列
[0069]	<400> 4
[0070]	aaccgctcga gcgcaaaaag gccatccgtc aggatg 36
[0071]	<210> 5
[0072]	<211> 34
[0073]	<212> DNA
[0074]	<213> 人工序列
[0075]	<400> 5
[0076]	cagaccagat ctatggcatt cggctttatc ggtc 34
[0077]	<210> 6

- [0078] <211> 32
[0079] <212> DNA
[0080] <213> 人工序列
[0081] <400> 6
[0082] caacgcagat ctcgtaatag cgaagaggcc cg 32
[0083] <210> 7
[0084] <211> 33
[0085] <212> DNA
[0086] <213> 人工序列
[0087] <400> 7
[0088] cagaccgaat tcatggcaca gcagcttaca gac 33
[0089] <210> 8
[0090] <211> 33
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列
[0093] <400> 8
[0094] cagaccgaat tcatggcaca gcagcttaca gac 33
[0095] <210> 9
[0096] <211> 35
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工序列
[0099] <400> 9
[0100] cagaccagat ctggtctggt tcctgtgtga aattg 35
[0101] <210> 10
[0102] <211> 33
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列
[0105] <400> 10
[0106] caacgcatcg attcaaggcg cactcccgtt ctg 33
[0107] <210> 11
[0108] <211> 34
[0109] <212> DNA
[0110] <213> 人工序列
[0111] <400> 11
[0112] caacgcatcg atagegaaga ggccccgacc gatc 34
[0113] <210> 12
[0114] <211> 26
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工序列

-
- [0117] <400> 12
[0118] caggaaacag accgaattca tggcac 26
[0119] <210> 13
[0120] <211> 24
[0121] <212> DNA
[0122] <213> 人工序列
[0123] <400> 13
[0124] gcatgcctgc aggtcgactt aagc 24

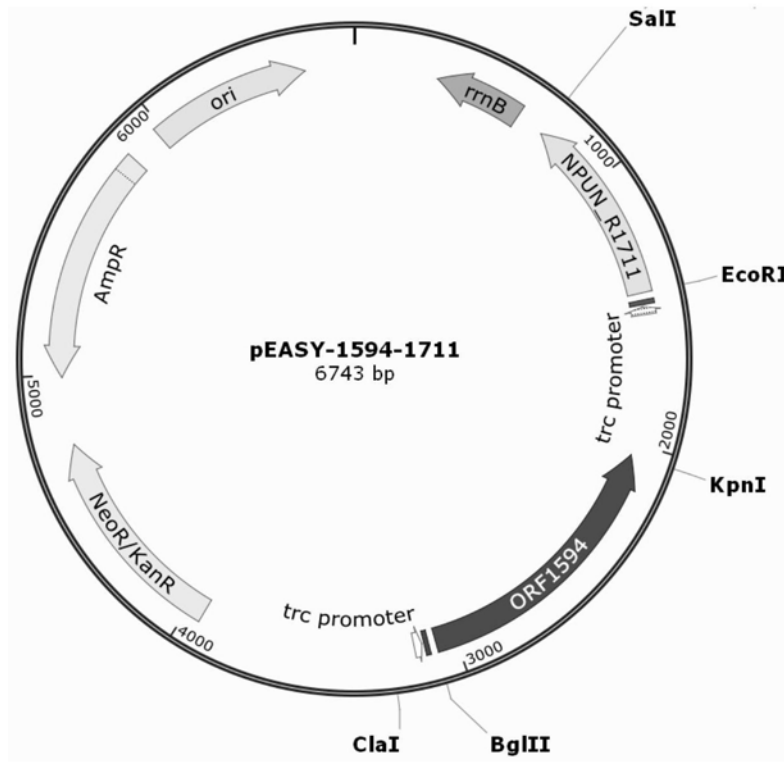


图1

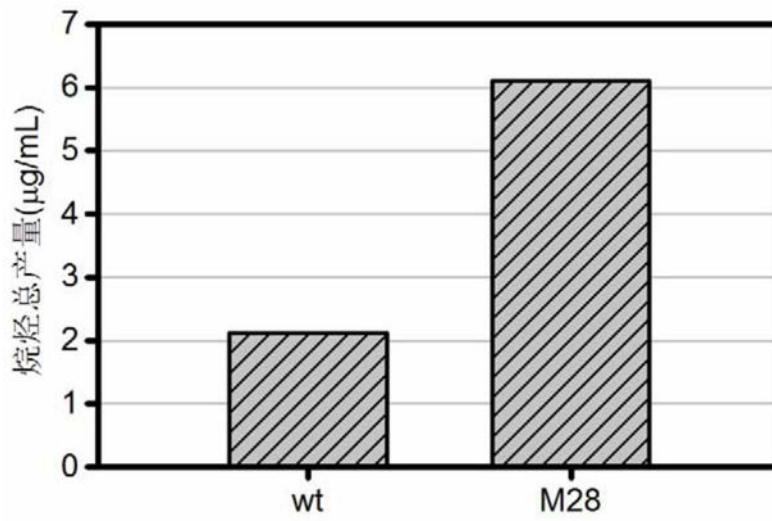


图2